

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

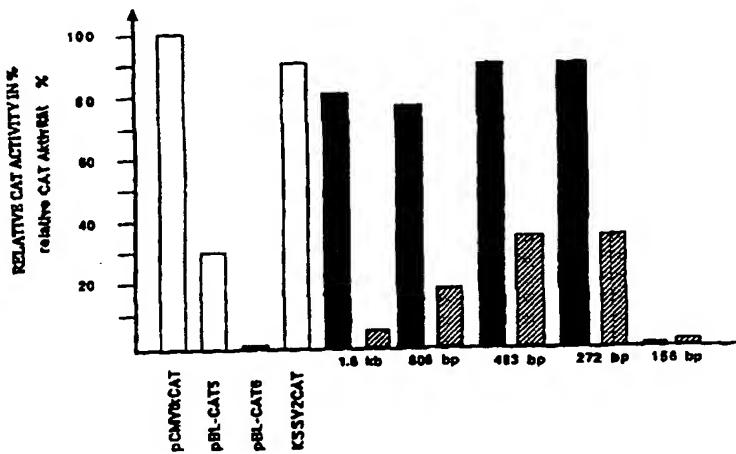
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12N 15/12, 15/85, C07K 14/47, C12Q 1/68		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/15664 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 1. Mai 1997 (01.05.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/04631			(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, MX, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 24. Oktober 1996 (24.10.96)			
(30) Prioritätsdaten: 195 39 493.3 24. Oktober 1995 (24.10.95) DE			Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): DR. KARL THOMAE GMBH [DE/DE]; D-88397 Biberach (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): ENENKEL, Barbara [DE/DE]; Martin-Luther-Strasse 7, D-88447 Warthausen (DE). GANNON, Frank [IE/DE]; Zähringerstrasse 19, D-69115 Heidelberg (DE). BERGEMANN, Klaus [DE/DE]; Hugo-Härting-Strasse 49, D-88400 Biberach (DE). NOE, Wolfgang [DE/DE]; Köhlesrain 87/1, D-88400 Biberach (DE).			
(74) Anwälte: LAUDIEN, Dieter usw.; Boehringer Ingelheim GmbH, A Patente, D-55216 Ingelheim am Rhein (DE).			

(54) Title: INTENSIVE HOMOLOGOUS PROMOTER OBTAINED FROM HAMSTERS

(54) Bezeichnung: STARKER HOMOLOGER PROMOTOR AUS HAMSTER



(57) Abstract

The invention concerns an intensive homologous promoter obtained from hamsters, in particular the promoter of the gene which codes for ubiquitin-S27a fusion protein. The promoter can be used in processes for preparing heterologous gene products in culture cells, in particular in Chinese hamster ovary cells.

(S7) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft einen starken homologen Promotor aus Hamster. Insbesondere handelt es sich dabei um den Promotor des Gens, das für das Ubiquitin-S27a-Fusionsprotein kodiert. Der Promotor kann für Verfahren zur Herstellung heterologer Genprodukte in Kulturzellen verwendet werden, insbesondere in CHO-Zellen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BV	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LJ	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Starker homologer Promotor aus Hamster

Die Erfindung betrifft einen starken homologen Promotor aus Hamster, Nukleinsäuren, die Promotor- und/oder regulatorische Sequenzen des Ubiquitin-S27a-Gens enthalten, sowie Verfahren zur Herstellung heterologer Genprodukte unter Verwendung solcher Nukleinsäuren.

Bei der wirtschaftlich bedeutenden Herstellung von Proteinen durch Expression rekombinanter Gene in eukaryontischen Wirtszellen, beispielsweise CHO-Zellen, werden bisher heterologe Expressionssysteme verwendet, d.h. daß zum Beispiel die Promotor/Enhancer- sowie Terminationselemente viralen Ursprungs sind. Die Verwendung von nichtviralen Promotoren an Stelle von viralen Sequenzen in Expressionssystemen wäre im Hinblick auf die Einstellung der Öffentlichkeit bezüglich Gen- und Biotechnologie von Vorteil und würde außerdem zur Biosicherheit der Vektorsysteme, die für die Expression von Genen in tierischen Zellkulturen verwendet werden, beitragen.

Beim Ubiquitin handelt es sich um ein hoch konserviertes Polypeptid von 76 Aminosäuren, das in allen eukaryontischen Zellen in großer Zahl zu finden ist und durch eine diverse Genfamilie kodiert wird (Reviews: Jentsch et al., 1991; Schlesinger & Bond, 1987). Ubiquitin spielt durch die Modifizierung von Targetproteinen eine bedeutende Rolle in einer Vielzahl von biologischen Prozessen, wie z.B. der ATP-abhängigen Protein degradation über den Ubiquitin-Proteosomen-Weg (Ciechanover, 1994). Auf Grund ihrer Struktur kann man die Ubiquitingene in zwei Gruppen einteilen. In der ersten Gruppe sind die Polyubiquitin-gene zusammengefaßt, in denen 228 bp große Ubiquitin-Kodiereinheiten (= 76 Aminosäuren) in Kopf-zu-Schwanzanordnung aneinandergereiht sind (Jentsch et al., 1991; Schlesinger & Bond, 1987). Die Anzahl der Einheiten variiert von Spezies zu Spezies, wobei man in den meisten Organismen zwei Polyubiquitingene unterschiedlicher Länge findet (Fornace et al., 1989; Wiborg et al., 1985). Die Promotorregionen dieser Gene enthalten eine TATA-Box und Promotor/Enhancer-Elemente für einen Hitzeschockinduktator (Schlesinger & Bond, 1987).

Die Ubiquitinfusionsgene werden der zweiten Gruppe zugeordnet. Es handelt sich dabei um Fusionen zwischen einer Ubiquitineinheit und einem ribosomalen Protein (Jentsch et al., 1991; Schlesinger & Bond, 1987). Die beiden bekannten Ubiquitinfusionsgene können auf Grund der Unterschiede in der Länge und Sequenz des ribosomalen Proteins identifiziert werden. In dem einen Fall handelt es sich um ein ribosomales Protein der großen Ribosomenuntereinheit mit einer Länge von 52 Aminosäuren (Baker et al., 1991) und in dem anderen Fall um ein ribosomales Protein der kleinen Ribosomenuntereinheit (in Säugern als

Protein S27a bezeichnet) mit einer speziesabhängigen Länge von 76 bis 81 Aminosäuren (Redman & Rechsteiner, 1989). Der Ubiquitinanteil in diesen Fusionsproteinen unterstützt dabei anscheinend die effiziente Integration der ribosomalen Proteine in das Ribosom (Finley et al., 1989).

Die individuellen Ubiquitingene werden in den verschiedensten Geweben eines Organismus und in verschiedenen Entwicklungsstadien in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert. So werden die Polyubiquitingene konstitutiv in geringem Level, der lediglich unter Stresseinwirkung stark erhöht wird, exprimiert (Fornace et al., 1989; Schlesinger & Bond, 1987). Die Ubiquitininfusionsgene werden vor allem verstärkt in der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert. In terminal differenzierten und wachstumsarretierten Zellen ist die Expression hingegen herunterreguliert (Schlesinger & Bond, 1987; Shimbara et al., 1993; Wong et al., 1993).

Die Aufgabe, deren Lösung der Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist, war die Bereitstellung starker nichtviralier Promotoren für Verfahren zur Herstellung heterologer Genprodukte in Kulturzellen, insbesondere Hamsterzellen.

Überraschend wurde ein Promotor eines Gens aufgefunden, der insbesondere in CHO-Zellen eine dem viralen SV40-Promotor gleichwertige Aktivität hat. Dieses Gen kodiert für das Ubiquitininfusionsprotein Ub/S27a. Der Ub/S27a-Promotor ist Gegenstand der Erfindung, insbesondere der Ub/S27a-Promotor aus Hamster. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Regulatorsequenzen in der 5' untranslatierten Region des Ub/S27a-Gens.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Nukleinsäuremolekül, das Promotorsequenzen und/oder andere regulatorische Sequenzen des Ub/S27a-Gens enthält. Bevorzugt sind dabei die Promotorsequenzen und/oder anderen regulatorischen Sequenzen aus dem Ub/S27a-Gen des Hamsters abgeleitet. Insbesondere ist ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül Gegenstand der Erfindung, das Promotorsequenzen und/oder andere regulatorische Sequenzen enthält, die in der Sequenz gemäß Abb. 5 enthalten sind.

Ein bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind Nukleinsäuremoleküle, die Sequenzen aus dem Bereich enthalten, der den Positionen -161 bis -45 gemäß Abb. 5 entspricht. Es liegt im Können des Fachmanns, mit den Methoden, die in Beispiel 4 beschrieben werden, Nukleinsäuremoleküle herzustellen, die Teilsequenzen der erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, insbesondere eine Teilsequenz des Bereichs von -161 bis -45, die ebenfalls starke Promotoraktivität vermitteln können. Solche Teilsequenzen sind daher ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Es liegt auch im Können des Fachmanns, die Promotorsequenz durch Substitution, Insertion, Deletion oder Addition von einer, zwei, drei oder mehr Basen gegenüber der Sequenz gemäß Abb. 5 zu verändern, ohne dadurch die Promotoraktivität, die mit der in Beispiel 4 beschriebenen Methode gemessen werden kann, deutlich zu erniedrigen. Unter einer deutlichen Erniedrigung der Promotoraktivität soll eine Erniedrigung um mehr als 50% des Wertes, der für das 272 bp-Deletionsfragment aus Tabelle 1 im CAT-Assay gemäß Beispiel 4 unter vergleichbaren Bedingungen erhalten wird, verstanden werden. Solche Varianten der Promotorsequenz sind daher ausdrücklich in die Erfindung eingeschlossen.

In den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen sind die Promotor- und/oder regulatorischen Sequenzen vorteilhaft mit einem Gen funktionell verknüpft, sodaß dieses Gen unter der Kontrolle dieser Sequenzen exprimiert werden kann. Ein solches Gen kann beispielsweise für Gewebeplasminogenaktivator (EP 0093619), ein *second-generation*-Plasminogenaktivator, z.B. tnk-t-PA (WO 93/24635), Interferon, z.B. Interferon- α (EP 0595241), Interferon- β (EP 0041313, EP 0287075), Interferon- γ (EP 0146354) oder Interferon- ω (EP 0170204), Tumornekrosefaktor (EP 0168214), Erythropoietin (WO 86/03520), Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (EP 0220520, EP 0237545) oder Mangan-Superoxiddismutase (EP 0282899) kodieren, die aus dem Stand der Technik bekannt sind. Es kann sich auch um ein Gen handeln, das für eine Immunglobulinkette, die variable Domäne einer Immunglobulinkette, einen humanisierten Antikörper (EP 0230400, EP 0451216), einen single-chain-Antikörper etc. kodiert. Insbesondere kann ein solches Gen für eine humanisierte Immunglobulinkette kodieren, die für variantes CD44 spezifisch ist (WO 95/33771). Zweckmäßig kann ein solches Nukleinsäuremolekül ein Expressionsvektor sein (Sambrook *et al.*, 16.3-16.29, 1989). Gegenstand der Erfindung sind besonders auch solche Expressionsvektoren, die nach der Einführung in eine eukaryontische Wirtszelle durch Rekombination in deren Genom integriert werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, in die eines der genannten Nukleinsäuremoleküle eingeführt wurde. Bevorzugt ist in eine solche Wirtszelle ein Expressionsvektor eingeführt, der das Gen für ein heterologes Genprodukt in Verknüpfung mit dem Promotor des Ub/S27a-Gens und/oder weiteren regulatorischen Sequenzen enthält. Die erfindungsgemäße Wirtszelle ist bevorzugt eine Säugerzelle. Insbesondere kann die Wirtszelle eine Hamsterzelle, z.B. eine CHO- (CHO = Chinese hamster ovary; Urlaub *et al.*, Chasin, 1980; vgl. auch Kaufman, 1987 sowie Referenzen darin, sowie Sambrook *et al.*, 16.28-16.29, 1989) BHK- (BHK = Baby hamster kidney) oder Hybridomzelle, besonders bevorzugt eine CHO-Zelle sein.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines heterologen Genprodukts in einer eukaryontischen Wirtszelle, vorzugsweise einer Hamsterzelle, besonders bevorzugt einer CHO-Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß eines der erwähnten Nukleinsäuremoleküle in die eukaryontische Wirtszelle eingeführt wird, die Wirtszelle kultiviert und das synthetisierte Genprodukt isoliert wird. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird das heterologe Genprodukt unter der Kontrolle von Promotorsequenzen und/oder regulatorischen Sequenzen des Ub/S27a-Gens, vorzugsweise aus Hamster, exprimiert. Vorteilhaft können für ein solches Verfahren Nukleinsäuremoleküle verwendet werden, die Promotorsequenzen und/oder regulatorische Sequenzen enthalten, die in der Abb. 5 enthalten sind. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem die Promotorsequenzen in der Sequenz enthalten sind, die den Positionen -161 bis -45 gemäß Abb. 5 entspricht. Auch hier liegt es im Können des Fachmanns, Teilsequenzen mit Promotoraktivität oder gleichwertige Varianten der offenbarten Sequenzen herzustellen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein starker homologer Promotor des Hamsters. Ein solcher Promotor, der für die Herstellung heterologer Genprodukte in Hamsterzellen, insbesondere CHO-Zellen sehr vorteilhaft ist, wird hiermit erstmalig bereitgestellt. Insbesondere betrifft die Erfindung einen starken homologen Promotor des Hamsters, der in CHO-Zellen im CAT-Assay gemäß Beispiel 4 eine größere Aktivität aufweist als der Thymidinkinasepromotor aus *Herpes simplex*. Vorteilhaft weist ein solcher Promotor eine Transkriptionsaktivität auf, die mindestens in der gleichen Größenordnung liegt wie diejenige des SV40-Promotors. In der gleichen Größenordnung soll hier bedeuten, daß der erfindungsgemäße Promotor mindestens 50%, besser mindestens 80%, noch mehr bevorzugt mindestens 90% der Aktivität des SV40-Promotors im CAT-Assay gemäß Beispiel 4 hat. Bevorzugt ist ein solcher Promotor dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens eines der Merkmale: GC-reicher Sequenzbereich, Sp1-Bindungsstelle, Polypyrimidinelement, Abwesenheit einer TATA-Box aufweist. Besonders bevorzugt ist ein solcher Promotor, der eine Sp1-Bindungsstelle bei Abwesenheit einer TATA-Box aufweist. Ferner ist ein solcher Promotor bevorzugt, der konstitutiv aktiviert ist und insbesondere unter serumhaltigen, serumarmen und serumfreien Zellkulturbedingungen gleichermaßen aktiv ist. In einer anderen Ausführungsform handelt es sich um einen induzierbaren Promotor, insbesondere um einen Promotor, der durch Serumzug aktiviert wird. Eine besonders vorteilhafte Ausführungsform ist ein Promotor mit einer Sequenz, die in Abb. 5 enthalten ist. Besonders bevorzugt ist dabei eine Sequenz, die in der Sequenz enthalten ist, die den Positionen -161 bis -45 gemäß Abb. 5 entspricht.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Expression eines heterologen Genprodukts in Hamsterzellen, vorzugsweise CHO-Zellen, das dadurch

gekennzeichnet ist, daß das Genprodukt unter der Kontrolle eines starken homologen Promoters des Hamsters exprimiert wird. In bevorzugten Ausführungsformen ist ein solcher Promotor durch Merkmale gekennzeichnet, wie sie im vorigen Absatz beschrieben wurden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines Promoters, wie er vorstehend beschrieben wurde, zur Herstellung eines heterologen Genprodukts in Hamsterzellen, vorzugsweise CHO- oder BHK-Zellen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Ub/S27a-Gen aus Hamster. Vorzugsweise hat ein solches Gen eine Sequenz gemäß Abb. 1 oder eine Sequenz, die unter stringenten Bedingungen mit einem Nukleinsäuremolekül mit der Sequenz gemäß Abb. 1 hybridisiert. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält ein solches Gen Promotor- und/oder regulatorische Sequenzen, wie sie in der Sequenz gemäß Abb. 5 enthalten sind.

Die beschriebenen Promotorsequenzen können in einer Expressionskassette in funktionellen Zusammenhang mit weiteren regulatorischen Sequenzen gebracht werden. Beispielsweise können sie mit Enhancer-Sequenzen funktionell verknüpft und so die Transkriptionsaktivität gesteigert werden. Dabei kann es sich um einen oder mehrere Enhancer und/oder mehrere Kopien einer Enhancer-Sequenz handeln. Beispielsweise kann dabei ein CMV- oder ein SV40-Enhancer verwendet werden. Der humane CMV-Enhancer gehört dabei zu den stärksten bisher identifizierten Enhancern. Ein Beispiel für einen induzierbaren Enhancer ist der Metallothionein-Enhancer, der durch Glukokortikoide oder Schwermetalle stimuliert werden kann. Eine weitere mögliche Modifikation wäre z.B. die Einführung multipler Sp1-Bindungsstellen. Die Promotorsequenzen können ferner mit regulatorischen Sequenzen kombiniert werden, die eine Steuerung/Regulierung der Transkriptionsaktivität gestatten. So kann der Promotor reprimierbar/induzierbar gemacht werden. Dies kann beispielsweise durch die Verknüpfung mit Sequenzen geschehen, die Bindungsstellen für positiv oder negativ regulierende Transkriptionsfaktoren darstellen. Der oben genannte Transkriptionsfaktor SP-1 beispielsweise hat einen positiven Einfluß auf die Transkriptionsaktivität. Ein weiteres Beispiel ist die Bindungsstelle für das Aktivatorprotein AP-1, das sowohl in positiver als auch in negativer Weise auf die Transkription einwirken kann. Die Aktivität des AP-1 kann durch verschiedenste Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokine und Serum, gesteuert werden (Faisst *et al.* Meyer, 1992, und Referenzen darin). Die Transkriptionseffizienz kann auch dadurch gesteigert werden, daß die Promotorsequenz durch Mutation (Substitution, Insertion, Deletion) von einer, zwei, drei oder mehr Basen verändert wird und dann im CAT-Test gemäß Beispiel 4 gemessen wird, ob sich dadurch die Promotoraktivität erhöht. Durch die in diesem Absatz beschriebenen Maßnahmen kann eine

optimierte Expressionskassette erhalten werden, die von hohem Nutzen für die Expression heterologer Genprodukte, insbesondere in CHO-Zellen, ist. Eine durch eine oder mehrere solcher Maßnahmen erhaltene Expressionskassette ist daher ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

In DNaseI-Footprint- und Mutationsanalysen kann untersucht werden, welche Faktoren die Expression beeinflussen und ob die Promotoraktivität durch die Deletierung von möglicherweise vorhandenen negativen Kontrollelementen und durch die Einführung von weiteren positiven Kontrollelementen noch gesteigert werden kann. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben außerdem gezeigt, daß die Expression des Ub/S27a-Genes ganz offensichtlich durch verschiedene Faktoren reguliert werden kann. So zeigte die Gruppe um Shimbara, daß bei einer terminalen *in vitro* Differenzierung von humanen Leukämie-Zellen (HL-60, K562, U937, THO1) durch Zugabe von verschiedenen Substanzen wie TPA (12-O-Tetra-decanoylphorhol-13-acetat), DMSO, Retinsäure und 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in das Kulturmedium die Expression des Ub/S27a-Genes herunterreguliert wird (Shimbara et al.; 1993). Und die Gruppe um Wong stellte eine Überexpression des Ub/S27a-Gens in Carcinomazellen des Enddarms fest (Wong et al., 1993). Die Genexpression korrelierte dabei mit den klinischen Tumorstadien mit einer höheren Expression in weiter fortgeschrittenem Krebs.

Die Ausführung der Erfindung ist dem Fachmann in Kenntnis des Offenbarungsgehaltes dieser Anmeldung mit an sich bekannten Methoden sowie gemäß der Beispiele möglich.

Das komplette Ub/S27a-Gen, die 5'-untranslatierte Region des Ub/S27a-Gen bzw. ausgewählte Fragmente davon können in Kenntnis der Sequenzen gemäß Abb. 1, 2 und 5 mit verschiedenen Standardmethoden erhalten werden. Aus der Sequenz gemäß Abb. 5 kann beispielsweise ein geeigneter Abschnitt ausgewählt und eine Oligonukleotid-Sonde chemisch synthetisiert werden, die die Sequenz dieses Abschnitts hat (Sambrook et al., 11.3-11.44, 1989). Mit einer solchen Sonde kann durch Hybridisierung aus einer genomischen Bibliothek (Sambrook et al., 9.4-9.62, 11.45-11.61, 1989) des Hamsters das Ub/S27a-Gen bzw. dessen 5'-untranslatierte Region kloniert werden. Die 5'-untranslatierte Region bzw. spezielle Fragmente davon können auch leicht durch PCR-Amplifikation mit entsprechenden Primern aus einer genomischen Bibliothek erhalten werden (Sambrook et al., 14.5-14.35, 1989). Diese Methode eignet sich besonders zur Herstellung ausgewählter Fragmente der Promotorregion, etwa des Bereichs von -161 bis -45 oder eines Abschnitts dieses Bereiches. Fragmente der 5'-untranslatierten Region wie etwa die in Tabelle 1 aufgeführten können auch durch limitierten Exonuklease III-Verdau aus größeren DNA-Fragmenten erhalten werden (Sambrook et al., 15.14-15.19; 5.84-5.85, 1989). Solche DNA-Fragmenten erhalten werden (Sambrook et al., 15.14-15.19; 5.84-5.85, 1989).

Moleküle können auch chemisch synthetisiert oder aus chemisch synthetisierten Fragmenten durch Ligation erzeugt werden. Das Ub/S27a-Gen einer anderen Species, vorzugsweise Säugerspecies, bzw. dessen 5'-untranslatierte Region kann durch Kreuzhybridisierung mit Sonden aus dem 5'-untranslatierten Bereich des Hamster-Ub/S27a-Gens oder etwa Sonden aus dem S27a-Anteil des Hamster-Ub/S27a-Gens isoliert werden.

Es steht im Stand der Technik eine Anzahl von Expressionsvektoren zur Verfügung, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden können. Die erfindungsgemäßen Promotor- und/oder regulatorischen Sequenzen können an Stelle der in diesen Vektoren vorhandenen Promotorelemente integriert werden und so die Expression des jeweiligen Gens steuern, das mit diesem Vektor exprimiert werden soll. Kommerziell erhältliche Vektoren, die sich zur Integration des erfindungsgemäßen Promoters gut eignen, sind beispielsweise der pCAT-Basic Vector (Promega; kompilierte Sequenz zugänglich über EMBL Accession No. X65322) oder der pCAT-Enhancer Vector, der zusätzlich noch einen SV40-Enhancer enthält (Promega; kompilierte Sequenz zugänglich über EMBL Accession No. X65319). Ein Beispiel für einen promotorlosen Vektor ist das Plasmid pBL-CAT6 (Boshart *et al.*, 1992; siehe auch Luckow *et al.* Schütz, 1987). Die erfindungsgemäßen Promotorsequenzen können in die HindIII-, SphI-, PstI-, SalI-, XbaI-, BamHI-, BglII- oder XhoI-Restriktionsschnittstellen dieses Vektors ligiert werden und so mit dem in diesem Vektor enthaltenen Chloramphenicol-Transferase (CAT)-Gen funktionell verknüpft werden. Anstelle des CAT-Gens kann auch ein anderes Gen, etwa für Gewebsplasminogenaktivator, in diesen Vektor integriert werden. Das CAT-Gen kann z.B. durch einen Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen XhoI und ClaI aus dem Vektor pBL-CAT6 entfernt werden. Die dabei deletierte SV40 3' untranslatierte Region, die die Intronsequenz und das Polyadenylierungssignal enthält, kann ggf. (d.h. sofern deren Funktion nicht durch die geneigten 3'-Sequenzen übernommen wird) nachfolgend wieder eingebaut werden, indem man z.B. diese SV40-Region mittels PCR amplifiziert und dabei gleich mit geeigneten Restriktionsschnittstellen an beiden Enden versieht, damit nachfolgende Umklonierungen, z.B. bei Einführung eines anderen gewünschten Genes, erleichtert werden. Eine andere Strategie der Auswechselung des CAT-Genes gegen ein anderes Gen ist, daß man zunächst mittels PCR und geeigneter mutagener Oligonukleotide eine singuläre Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende der SV40-Region in den Vektor pBL-CAT6 einführt, die es nachfolgend ermöglicht, gezielt das CAT-Gen zu entfernen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung des Vektors pLUC, der im Prinzip wie pBL-CAT6 aufgebaut ist, aber anstelle des CAT-Gens ein Luciferase-Reportergen enthält. Dieses läßt sich leicht durch einen XhoI/EcoNI-Doppelverdau entfernen, wobei die SV40-Sequenz im Vektor verbleibt.

Zur Erzeugung stabiler Zelllinien mit hoher Expression des heterologen Gens wählt man vorteilhaft einen Vektor, der die Selektion von Transformanten gestattet, die den Vektor in ihr Chromosom integriert und das integrierte heterologe Gen amplifiziert haben. Vektoren für solche Selektions-/Amplifikationsverfahren wie das DHFR/Methotrexat-Verfahren in DHFR-defizienten Zelllinien (z.B. CHO-DUKX) sind ebenfalls Stand der Technik (Sambrook *et al.*, 16.9-16.15; 16.28-16.29, 1989).

Verfahren zur Einbringung der erhaltenen Vektoren in Wirtszellen ebenso wie die Selektion und Kultur der Transformanten kann der Fachmann Standardwerken entnehmen (z.B. Sambrook *et al.*, 16.3-16.81, 1989).

Abgesehen von der Optimierung des Promoters bietet sich noch ein ganz anderer Ansatzpunkt zur Verbesserung der Produktausbeute, und zwar über einen Gendosiseffekt. Mit steigender Kopienzahl der ins Genom integrierten Vektorkonstrukte sollte auch die Menge an produzierten Transkripten zunehmen. Eine spontane Amplifikation der eingeführten Konstrukte, die in einer stabilen Integration einer Vielzahl von Kopien resultiert, kann durch die Verwendung einer Sequenz mit amplifikationsfördernden Eigenschaften, sogenannten "amplification promoting sequences", erzielt werden. Eine solche Sequenz, die einen sehr hohen AT-Gehalt besitzt, war z.B. aus der nicht-transkribierten Intergenregion der ribosomalen Mausgene isoliert worden (Wegner *et al.*, 1989) und wurde bereits erfolgreich zur stabilen und effizienten Inhibierung der HIV-1 Replikation durch antisense RNA eingesetzt (Meyer *et al.*, 1993). Ein 49 bp großer Sequenzbereich der Ub/S27a 5' untranslatierten Region (Position - 1477 bis - 1429; Abb.4) mit einem hohen AT-Gehalt von 88% weist große Homologie zu den oben beschriebenen amplifikationsfördernden Sequenzen der Maus auf. Daß dieser CHO-Sequenzbereich ebenfalls solche Eigenschaften besitzt, kann durch den Einsatz von Ub/S27a-Promotorkonstrukten, denen diese CHO-Sequenz vorgeschaltet ist, überprüft werden.

30

Beschreibung der Abbildungen

Abb.1: Vergleich der DNA-Sequenz des kompletten Ubiquitin/S27a cDNA-Klons aus CHO-Zellen mit der humanen cDNA-Sequenz. Vergleich der CHO Ub/S27a cDNA-Sequenz mit der humanen cDNA-Sequenz (Adams *et al.*, 1992). Identitäten innerhalb der Sequenz sind durch "*" hervorgehoben. Der Ubiquitinanteil ist durch Doppellinien über der Sequenz gekennzeichnet. Die Positionen der drei Introns sind durch Dreiecke markiert.

Poly A Signal :::: Startkodon +++ Stoppkodon

5 *Abb. 2: Aminosäuresequenz des Ubiquitin-fusionsproteins Ub/S27a.* Vergleich der aus der CHO cDNA -Sequenz abgeleiteten Ub/S27a-Aminosäuresequenz mit der humanen Aminosäuresequenz (Adams et al., 1992). Identitäten innerhalb der Sequenzen sind durch "*" gekennzeichnet. Die Ubiquitineinheit von 76 Aminosäuren ist durch Doppelstriche über der Sequenz hervorgehoben.

10

Abb. 3: Analyse der Ub/S27a-Transkriptlevel in CHO-Zellen. Die denaturierte zytoplasmatische Gesamt-RNA (10 µg) von serumkultivierten und serumfrei kultivierten CHO-Zellen wurde in einem Formaldehyd-haltigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Als Hybridisierungsprobe wurde die 32 P-markierte Ub/S27a-cDNA (508 bp) aus CHO eingesetzt. Die Expositionszeit des Röntgenfilms betrug 3 Stunden.

- 1 + 3 serumkultivierte CHO-Zellen
- 20 2 + 4 serumfrei kultivierte CHO-Zellen
- 5 serumkultivierte CHO-Zellen wurden für 24 Stunden in serumfreiem Medium kulti-
viert
- 6 serumfrei kultivierte CHO-Zellen wurden für 24 Stunden in serumhaltigem Medium
kultiviert

25

30 *Abb. 4: Strategie zur Sequenzierung der Ub/S27a 5' untranslatierten Region.* Die 2.5 kb große 5' untranslatierte Region des Ub/S27a-Gens ist schematisch dargestellt. Es wurden sowohl subklonierte Restriktionsfragmente als auch durch Exonuklease III-Verdau erzeugte Deletionsklone sequenziert, wobei Ausmaß und Richtung der Sequenzierungen durch Pfeile angezeigt sind.

35 *Abb. 5: Genomische DNA-Sequenz der Ub/S27a 5' untranslatierten Region.*

Zeichenerklärung:

->	Restriktionsschnittstellen
	5' Ende der Promotordeletionsklone

*	3' Ende der Promotordeletionsklone
~~~~~	Homologie zu amplifikationsfördernden Sequenzen
	polypyrimidinreicher Sequenzbereich
:::	Startkodon
5 + 1, + 13	durch S1 Nukleasekartierung bestimmte Transkriptionsstartstellen
+ 85	über Primer-Extension erhaltenes 5' Ende
> > > > >	Sp1-Bindungsstelle

Die Nukleotide sind in Relation zur Transkriptionsstartstelle, die mit +1 bezeichnet ist, numeriert. Die Restriktionsschnittstellen für SacII und EagI, die für GC-reiche Sequenzbereiche spezifisch sind, sowie die zu Subklonierungszwecken herangezogenen Restriktionsschnittstellen für EcoRI, HincII und HindIII sind in der Sequenz durch Unterstreichung hervorgehoben. Zur Kennzeichnung der Intronsequenz wurden Kleinbuchstaben verwendet. Die Aminosäuresequenz ist unter der DNA-Sequenz wiedergegeben.

15

*Abb. 6: Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes durch Primer-Extension.* Die Primer-Extensionsanalyse wurde mit 5 µg zytoplasmatischer Gesamt-RNA von serumkultivierten CHO-Zellen durchgeführt (Bahn 1). Als Kontrolle wurde 5 µg Hefe tRNA verwendet (Bahn 2). Der eingesetzte ³²P-endmarkierte Primer hybridisierte mit dem S27a-Anteil der Ub/S27a mRNA (Nukleotide + 256 bis + 276 in der cDNA-Sequenz). Die Extensionsprodukte wurden in einem 6%igen denaturierendem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Größenmarker wurde eine Sequenzierungsreaktion benutzt. Die Länge des Extensionsproduktes, dessen Position durch einen Pfeil gekennzeichnet ist, betrug 304 Nukleotide.

25

*Abb. 7: Ermittlung des Transkriptionsstartpunktes durch S1 Nuklease-Kartierung.* Eine der Gegenstrangsequenz entsprechende ³²P-endmarkierte Einzelstrangprobe, die den gesamten Bereich der 5' untranslatierten Region (- 2289 bis + 176) umfaßte, wurde mit 5 µg Gesamt-RNA (Bahn 2) bzw. zytoplasmatischer Gesamt-RNA (Bahn 3) aus serumkultivierten CHO-Zellen hybridisiert. Als Kontrolle wurde 5 µg Hefe tRNA eingesetzt (Bahn 1). Die vor dem S1 Nuklease-Abbau geschützten Fragmente wurden in einem 8%igen denaturierendem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Größenmarker diente eine Sequenzierungsreaktion, in der der zur eingesetzten Hybridisierungsprobe komplementäre DNA-Strang sequenziert wurde. Der zur Sequenzierung benutzte Primer hybridisierte dabei mit der Nukleotidsequenz von + 157 bis + 176. Die Positionen der abbaugeschützten DNA-Fragmente sind in der hervorgehobenen Sequenz durch Pfeile markiert. Dem distalen Transkriptionsstartpunkt wurde die Nukleotidposition +1 zugeordnet.

*Abb. 8: Funktionelle Analyse der Ub/S27a-Promotoraktivität.* Vektorkonstrukte, in denen serielle Deletionen der 5' flankierenden Region des Ub/S27a-Gens in beiden Orientierungen mit dem CAT-Reportergen fusioniert worden waren, wurden zur transienten Transfektion von serumkultivierten CHO-Zellen eingesetzt. Als Kontrolle wurden Plasmide eingesetzt, in denen das CAT-Reportergen unter der Kontrolle eines viralen Promotors stand. Insgesamt wurden vier voneinander unabhängige Transfektionsexperimente durchgeführt.

Die relative CAT-Aktivität der verschiedenen Vektorkonstrukte ist als Prozent der CAT-Aktivität in pCMVtkCAT transfizierten CHO-Zellen, die als 100% angenommen wurde, angegeben und repräsentiert den Mittelwert (Standardabweichung in allen Fällen  $\leq$  5%) aus den vier Transfektionsexperimenten. Sämtliche CAT-Aktivitäten wurden bezüglich eingesetzter Proteinmenge sowie Transfektionseffizienz, die durch Messung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität des co-transfizierten Kontrollplasmides pCMVtklacZ bestimmt wurde, korrigiert.

- Kontrollplasmide: ohne Promotor oder virale Promotoren (tk, SV40)
- Ub/S27a 5' untranslatierte Region: 5'-3' Orientierung in pBL-CAT6
- Ub/S27a 5' untranslatierte Region: 3'-5' Orientierung in pBL-CAT6

*Abb. 9: Funktionelle Analyse der Aktivität des Ub/S27a-Promotors in transient transfizierten BHK-Zellen (BHK21).*

- Kontrollplasmide: ohne Promotor oder virale Promotoren (tk, SV40)
- Ub/S27a 5' untranslatierte Region: 5'-3' Orientierung in pBL-CAT6

*Abb. 10: Funktionelle Analyse der Aktivität des Ub/S27a-Promotors in stabil transfizierten CHO-Zellen (I).* Dargestellt ist die CAT-Aktivität in Zellen, die mit dem Vektor pCMVtkCAT (tk-Promotor/CMV-Enhancer) oder dem Vektor pBL-CAT5 (tk-Promotor) stabil transfiziert wurden (vgl. Beispiele/Plasmide, Beispiel 6). Gezeigt sind jeweils mehrere verschiedene Klone. Die CAT-Aktivität ist auf die Aktivität des Klons pCMVtkCAT 6, der die höchste Aktivität hatte, normiert (=100%). Die Graphik dient dem Vergleich mit den Abbildungen 11 und 12.

Abb. 11: Funktionelle Analyse der Aktivität des Ub/S27a-Promotors in stabil transfizierten CHO-Zellen (II). Gezeigt ist die CAT-Aktivität verschiedener Vektorkonstrukte, die als Prozent der CAT-Aktivität des Klons 6 der mit pCMVtkCAT transfizierten CHO-Zellen aus Abb. 10 dargestellt ist. Fragmente aus der Promotorregion gemäß Tabelle 1 wurden in pBL-CAT6 in 5' → 3'-Orientierung integriert. Die Abszisse gibt an, welches Fragment verwendet wurde. Gezeigt ist die Aktivität von jeweils mehreren verschiedenen Klonen.

Abb. 12: Funktionelle Analyse der Aktivität des Ub/S27a-Promotors in stabil transfizierten CHO-Zellen (III). Gezeigt ist die CAT-Aktivität verschiedener Vektorkonstrukte, die als Prozent der CAT-Aktivität des Klons 6 der mit pCMVtkCAT transfizierten CHO-Zellen aus Abb. 10 dargestellt ist. Fragmente aus der Promotorregion gemäß Tabelle 1 wurden in pBL-CAT6 in 5' → 3'-Orientierung integriert. Die Abszisse gibt an, welches Fragment verwendet wurde. Gezeigt ist die Aktivität von jeweils mehreren verschiedenen Klonen.

Abb. 13: Funktionelle Analyse der Aktivität des Ub/S27a-Promotors in stabil transfizierten CHO-Zellen (IV). Diese Abbildung stellt eine Zusammenfassung der Daten der Abbildungen 10 bis 12 dar. Gezeigt sind die Zellklone mit der höchsten und der niedrigsten CAT-Expression für jedes Vektorkonstrukt, das in diesem Experiment verwendet wurde (nur Plasmide mit 5' → 3'-Orientierung des Ub/S27a-Promotors).

25

### Beispiele

#### 30 Plasmide

Für die Durchführung sämtlicher Genmanipulationen wurde der Vektor pBluescript SK- verwendet (Stratagene Cloning Systems, Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland). Zur Expressionsanalyse wurden eukaryontische Expressionsvektoren eingesetzt, die das als 35 Reportergen dienende bakterielle Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Gen enthielten. Das CAT-Gen ist dabei mit verschiedenen viralen Promotoren fusioniert. In pBL-CAT5 ist es der Thymidinkinasepromotor (tk) des Herpes simplex Virus (Boshart et al., 1992; kompilierte Sequenz zugänglich über GenBank Accession No. M80483), in pCMVtkCAT der

tk-Promotor in Kombination mit einem Enhancer des humanen Cytomegalievirus (CMV) (Christoph Winkler, Würzburg) und in pKSSV2CAT der SV40-Promotor (Tsonis et al., 1988). pBL-CAT6 diente als Negativkontrolle und enthält ein promotorloses CAT-Gen (Boshart et al., 1992; kompilierte Sequenz zugänglich über GenBank Accession No. M80484). Im Vektor pCMVtklacZ steht die Expression des bakteriellen  $\beta$ -Galactosidase-Gens unter der Kontrolle der CMV-Enhancer/tk-Promotorkombination (Christoph Winkler, Würzburg).

10 **Zellkultur**

CHO-DUKX Zellen (Urlaub und Chasin, 1980) wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Ham's F12 Medium (1:1), supplementiert mit 5% fötalem Kälberserum, in Roux-Flaschen in einem CO₂ begasbaren Brutschrank bei 90% Luftfeuchtigkeit, 37°C und 15 5% CO₂ kultiviert. Für die serumfreie Kultivierung wurden CHO-DUKX Zellen verwendet, die langsam an ein Wachstum in Medium ohne Serum adaptiert worden waren und nun permanent in serumfreiem Medium kultiviert werden. Diese Zellen wurden als Suspensionskulturen in Spinnerflaschen in Iscove's Modified Dulbecco's Medium/Ham's F12 Medium (1:1) kultiviert, das mit niedermolekularem Pepton (Aldag, Hamburg), Insulin und 20 Transferrin (Canada Packars) supplementiert wurde.

*Beispiel 1: Differentielle Hybridisierung rekombinanter CHO cDNA Genbanken*

25 Unter Verwendung von polyadenylierter mRNA aus CHO-Zellen, die entweder in Serum oder ohne Serum kultiviert worden waren, wurden zunächst zwei cDNA Genbanken in  $\lambda$ ZAPII, bestehend aus  $4.2 \times 10^6$  bzw.  $2.9 \times 10^5$  rekombinanten Phagenklonen, hergestellt.

30 Die zytoplasmatische RNA wurde von NP40-lysierten Zellen präpariert und durch Phenol/Chloroform-Extraktionen gereinigt (Nicolaides und Stoeckert, 1990). Polyadenylierte mRNA von CHO-Zellen, die mit oder ohne Serum kultiviert worden waren, wurde durch Affinitätschromatographie an einer Oligo(dT)-Cellulosesäule gewonnen (Sambrook et al., 1989). Zur Herstellung der cDNA wurde das cDNA Synthesekit von Pharmacia LKB verwendet, wobei zur Erststrangsynthese ein Oligo (dT)-Primer eingesetzt wurde. Die cDNA wurde in den EcoRI-verdauten Vektor  $\lambda$ ZAPII kloniert (Strategene Cloning Systems). Filterduplicata der nicht-amplifizierten CHO cDNA Genbank aus serumfrei kultivierten CHO-Zellen wurden durch differentielle Hybridisierung gescreent. Als Probe wurde Gesamt-

cDNA von serumkultivierten und serumfrei kultivierten CHO-Zellen eingesetzt, die durch "random priming" (Prime a Gene labelling Kit; Promega Cooperation, Promega Biotec, Madison, WI, USA) mit ( $\alpha$ -³²P) dCTP (6000 Ci/mmol; Amersham International plc, Amersham-Buchler, Braunschweig, Deutschland) markiert worden war. Die Hybridisierung wurde wie in der Northern Blot Analyse (s.u., Beispiel 2) beschrieben durchgeführt. Phagenplaques, die mit beiden cDNA-Proben eine starke Hybridisierung zeigten, wurden isoliert und nochmals einer differentiellen Hybridisierung unterzogen. Aus den rekombinanten  $\lambda$ ZAPII Phagen wurden Phagemide durch *in vivo* Exzision unter Einsatz des Helferphagen R408 gewonnen ( $\lambda$ ZAPII cloning kit-Protokoll; Stratagene Cloning Systems).

10 Ungefähr 6000 Phagenklone wurden so gescreent. Insgesamt wurden 12 rekombinante Phagenklone isoliert, die eine besonders starke Hybridisierung mit beiden Gesamt-cDNA-Proben zeigten.

15 DNA-Sequenzen wurden nach der Didesoxymethode unter Verwendung des T7 Sequenzierungskits von Pharmacia LKB ermittelt. Als Primer wurden sowohl T3 und T7 Promotorprimer als auch genspezifische Primer eingesetzt. In allen Fällen wurden die DNA-Proben mit [ $\alpha$ -³⁵S] dATP bzw. [ $\alpha$ -³⁵S] dCTP (10  $\mu$ Ci; Amersham International plc) markiert. Die Reaktionsprodukte wurden in einem 6%igen Polyacrylamid-Sequenzierungsgel 20 elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Sequenzanalyse wurden die Datenbanken von GenBank und EMBL herangezogen.

25 Einer der isolierten cDNA-Klone kodierte für ein Fusionsprotein, Ub/S27a, bestehend aus einer Ubiquitin-Monomereinheit und einem ribosomalen Protein der kleinen Untereinheit, S27a (Abb.1). Die größte Homologie besteht mit der humanen Ub/S27a-Sequenz (Adams et al., 1992) mit 92.2 % Homologie auf cDNA-Ebene und 100 % Homologie auf Aminosäure-Ebene. Die isolierte CHO Ub/S27a cDNA ist 508 bp groß und umfaßt die gesamte Kodierregion sowie ein Polyadenylierungssignal im 3' untranslatierten Bereich und zwei einander überlappende Translationsinitiationselemente in der 5' untranslatierten Region 30 (Abb.1). Anhand der cDNA-Sequenz wird auch ersichtlich, daß es sich um ein echtes Fusionsgen handelt, d.h. beide Proteinanteile werden von einem einzigen Gen kodiert. Die Proteinsequenz des resultierenden Fusionsproteins ist hoch konserviert, wobei die ersten 76 Aminosäuren des 156 Aminosäure großen Proteins den Ubiquitinanteil umfassen (Abb.2).

*Beispiel 2: Analyse der Ub/S27a-Genexpression*

Das Ausmaß der Ub/S27a-Genexpression wurde in Northern Blot Experimenten, in denen zytoplasmatische Gesamt-RNA von serumkultivierten und serumfrei kultivierten CHO-Zellen verwendet wurde, untersucht.

Die zytoplasmatische RNA wurde von NP40-lysierten Zellen präpariert und durch Phenol/Chloroform-Extraktionen gereinigt (Nicolaides und Stoeckert, 1990). Gesamt-RNA (10 µg) wurde elektrophoretisch in einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham International plc) transferiert (Sambrook et al., 1989) und durch eine 5minütige UV-Bestrahlung (254 nm) kovalent mit der Nylonmembran vernetzt. Die RNA-Filter wurden über Nacht bei 65°C in einer Lösung bestehend aus 4x SSC, 10x Denhardt, 0.1% SDS und  $1 \times 10^6$  cpm/ml  32 P-markierter cDNA-Probe hybridisiert. Die cDNA-Fragmente wurden unter Verwendung von "random primer" markiert (Prime a Gene labeling kit; Promega Corporation), wobei die spezifische Aktivität der DNA-Proben  $4 - 8 \times 10^8$  cpm/µg DNA betrug. Nach der Hybridisierung wurden die Filter zweimal in 0.2x SSC/0.1 % SDS bei 65°C für 20 Minuten gewaschen. Auf die in Haushaltsfolie eingewickelten Filter wurde ein Röntgenfilm (Curix; Agfa-Gevaert N.V.) gelegt und die Autoradiographie für 3 Stunden bei -70°C durchgeführt.

Sowohl in den unter Standardbedingungen mit Serum kultivierten CHO-Zellen als auch in den an das Wachstum in serumfreiem Medium adaptierten CHO-Zellen ließen sich Ub/S27a-Transkripte mit einer Länge von ungefähr 600 Nukleotiden in großer Zahl und gleichen Mengen nachweisen (Abb.3). Bei den beiden zusätzlichen Transkripten von ungefähr 1500 und 2800 Nukleotiden handelt es sich um Polyubiquitintranskripte, in denen mehrere Ubiquitin-Monomereinheiten miteinander fusioniert sind. Die Polyubiquitintranskripte, die unter diesen Kulturbedingungen zu einem erheblich geringeren Level exprimiert werden, hybridisieren mit dem Ubiquitinanteil der in den Northern Blot Analysen als Probe eingesetzten Ub/S27a cDNA. Der Ub/S27a Transkriptlevel blieb unverändert hoch, wenn die permanent in serumfreiem Medium wachsenden CHO-Zellen für 24 h in serumhaltigem Medium kultiviert wurden (Abb.3). Ein anderes Bild bot sich, wenn die unter Standardbedingungen serumkultivierten CHO-Zellen für 24 h in serumfreies Medium überführt wurden. Die Zahl der Ub/S27a-Transkripte nahm erheblich ab (Abb.3). Dieses ist darauf zurückzuführen, daß sich der überwiegende Teil der CHO-Zellen während dieser 24stündigen Kultivierungsphase in serumfreiem Medium nicht mehr teilten und zudem eine Reduktion im Zellvolumen aufwiesen. In Zellen, die ein solches Stadium erreicht haben, findet, wenn überhaupt, nur noch eine geringe Transkription statt.

*Beispiel 3: Isolierung und Analyse der Ub/S27a-Promotorregion*

Zur Isolierung der Promotorregion des Ub/S27a-Gens wurde zunächst eine genomicsche CHO-Genbank mit über eine Million rekombinanter Phagenklone hergestellt, wobei 5 genomicische DNA von serumkultivierten CHO-Zellen verwendet wurde.

Die genomicische DNA wurde von NP40-lysierten Zellen nach einem Protokoll von Nicolaides und Stoeckert gewonnen (Nicolaides & Stoeckert, 1990). Im Gegensatz zu der beschriebenen Ausalzungsmethode wurde die DNA jedoch nach dem Proteinase K1 Verdau 10 dreimal mit Phenol/ Chloroform extrahiert.

Die DNA-Enden von partiell mit Sau3AI verdauter genomicischer DNA mit einer durchschnittlichen Fragmentgröße von 20 kb wurden halbseitig unter Verwendung von dGTP und dATP aufgefüllt und mit XhoI-verdautem Vektor λGEM-12 (halbseitig mit 15 dTTP und dCTP aufgefüllte DNA-Enden; Promega Corporation) ligiert. Zur Verpackung wurden kommerziell erhältliche Extrakte eingesetzt (Gigapack II Plus packaging extracts; Stratagene Cloning Systems).

Diese genomicische Genbank wurde lediglich mit dem S27a-Anteil der Ub/S27a-cDNA 20 hybridisiert, um eine Kreuzhybridisierung mit den Polyubiquitingen zu vermeiden. Einer der isolierten Genomklone mit einer Gesamtlänge von 14 kb enthielt unter anderem die komplette Kodierregion und 2.5 kb der 5' untranslatierten Region. Die Kodierregion wird durch drei Introns mit korrekten Konsensussequenzen an den Exon/Intron- und Intron/Exon-Übergängen unterbrochen (Breathnach & Chambon, 1981), wobei zwei dieser 25 Introns im Ubiquitinanteil und das dritte Intron im S27a-Anteil lokalisiert sind (Abb.1).

Beide DNA-Stränge der 5' untranslatierten Region wurden komplett sequenziert (Methode s. Beispiel 1). Das geschah durch Sequenzierung von subklonierte Restriktionsfragmenten sowie durch Sequenzierung von überlappenden Deletionsklonen, die durch 30 Exonuklease III Verdau erzeugt worden waren (Abb.4). Die potentielle Promotorregion enthält keine TATA-Box, dafür aber einen CpG-reichen Sequenzbereich (67% GC von - 144 bis + 129), in dem auch die singuläre Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp1 (Dynan & Tjian, 1983) und je eine Restriktionsschnittstelle für EagI und SacII, die für solche GC-reiche Regionen spezifisch sind, liegen, sowie polypyrimidinreiche Sequenzbereiche 35 (Abb.5).

Zur Lokalisierung des Transkriptionsstartpunktes wurden sowohl Primer-Extension als auch S1 Nuklease-Kartierung an Gesamt-RNA von serumkultivierten CHO-Zellen vor-

genommen. Um eine Extension von Polyubiquitin-Transkripten zu vermeiden, wurde für die Primer-Extension ein Primer verwendet, der mit dem S27a-Anteil der Ub/S27a mRNA hybridisierte (komplementär zu den Nukleotiden + 256 - 276 bp in der cDNA-Sequenz).

Ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-GTGGTGTAGGACTTCTTCTTC-3', komplementär zu den Nukleotiden + 256 bis + 276 in der Ub/S27a cDNA-Sequenz, wurde mit 5 µg zytoplasmatischer Gesamt-RNA aus serumkultivierten CHO-Zellen hybridisiert und verlängert (Ausubel et al., 1987).

Die zur S1 Nuklease-Kartierung eingesetzte Einzelstrangprobe, die den Bereich von - 2289 bis + 176 der genomischen Ub/S27a-Sequenz umfaßte, wurde über PCR wie folgt gewonnen. Die 5' untranslatierte Region der Ub/S27a-Genomsequenz (-2289 bis + 240) wurde in 5' - 3' Orientierung in den Vektor pBluescript SK- (Stratagene Cloning Systems) kloniert. Dieses Hybridplasmid wurde in der PCR als Matrize eingesetzt. Zur Amplifizierung wurden ein biotinylierter T3-Promotorprimer und ein mit [ $\gamma$ -³²P] ATP-markierter Ub/S27a-spezifischer Primer (5'-CTCGAGCGTGATCGTTTCC-3', komplementär zu den Nukleotiden + 157 bis + 176 der Ub/S27a-Genomsequenz) verwendet. Die Gewinnung des zur RNA-Sequenz komplementären Einzelstranges erfolgte durch alkalische Denaturierung des an magnetische Streptavidinbeads gebundenen PCR-Produktes (Dynabeads M-280 Streptavidin Protokoll; Dynal A.S., Norway). 2 x 10⁵ cpm der Einzelstrangprobe wurden mit 5 µg Gesamt-RNA aus serumkultivierten CHO-Zellen über Nacht bei 55°C hybridisiert und die Hybridisierungsprodukte wurden nachfolgend mit S1 Nuklease behandelt (Ausubel et al., 1987).

Das über Primer-Extension erhaltene Produkt wies eine Länge von 304 Nukleotiden auf (Abb.6), womit der Transkriptionsstartpunkt 44 bp stromaufwärts vom Startkodon innerhalb eines Polypyrimidinelements liegen würde (Abb.5). Dieser Startpunkt konnte durch die S1 Nuklease-Kartierung allerdings nicht verifiziert werden. Über die S1 Nuklease-Kartierung wurden zwei Transkriptionsstartpunkte ermittelt (Abb.7), die 128 bp bzw. 116 bp stromaufwärts vom Startkodon innerhalb einer Polypyrimidinsequenz liegen und deren Positionen im nachfolgenden als Position +1 und +13 angegeben werden (Abb.5, Abb.7). Die wahrscheinlichste Erklärung für die zu beobachtende Diskrepanz zwischen den beiden Kartierungsmethoden ist eine vorzeitige Terminierung der Primer-Extensionsreaktion. Bedingt durch die Positionierung des Primers in der S27a-Sequenz liegt die Länge des zu erwartenden Extensionsproduktes mit über 300 Basen über der optimalen Länge von ungefähr 100 Basen. Je größer die Entfernung zwischen der Primerposition und der gesuchten Transkriptionsstartstelle ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit eines vorzeitigen Abbruchs der reversen Transkription durch GC-reiche Sequenzen und Sekundärstrukturausbildungen

innerhalb der mRNA. Für die S1 Nuklease-Kartierung wurde hingegen eine den gesamten 5' untranslatierten Bereich umfassende Einzelstrangprobe eingesetzt (Sequenzbereich - 2289 bis + 176; Abb.5), die aus einem PCR-Produkt gewonnen wurde, wodurch die bei der Primer-Extension auftretenden Probleme der reversen Transkription von GC-reichen Sequenzen umgangen wurden.

Unsere Untersuchungen der 2.5 kb großen 5' untranslatierten Region zeigten, daß der mögliche Promotor weder eine TATA-Box noch eine CAAT-Box besaß. Dafür aber zeichnete sich die stromaufwärts vom Startkodon gelegene Sequenz durch einen hohen GC-Gehalt aus. Innerhalb dieser Sequenz wurde eine singuläre Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp1 vorgefunden. Über S1 Nuklease-Kartierung wurden zwei prominente Transkriptionsstartpunkte, die innerhalb einer Polypyrimidinsequenz 128 bzw. 116 bp stromaufwärts vom Startkodon lagen, identifiziert.

15

***Beispiel 4: Identifizierung und Eingrenzung des Sequenzbereiches mit Promotoraktivität***

***Herstellung von Deletionsklonen durch Exonuklease III Verdau***

Über Exonuklease III-Verdau wurde eine Serie von 5' Deletionsklonen hergestellt (Tab.1). Die 5' untranslatierte Region des Ub/S27a-Gens (-2289 bis + 240) wurde dazu in beiden Orientierungen in die HincII-Schnittstelle des Vektors pBluescript SK- (Stratagene Cloning Systems) kloniert. Zur Einführung von unidirektionalen Deletionen wurden diese Hybridplasmide mit KpnI und XhoI verdaut und mit Exonuklease III, wie in dem Protokoll des eingesetzten "Erase-a-base"-Kits beschrieben (Promega Corporation), behandelt. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden als BamHI-Fragmente in die singuläre BamHI-Schnittstelle des Vektors pBL-CAT6 integriert.

Vor Beginn des Exonuklease III-Verdaus kann der Vektor pBluescript Sk- auch durch Einführung von Adaptoren, die geeignete Restriktionsschnittstellen enthalten, modifiziert werden, um nachfolgende Genklonierungsexperimente zu erleichtern. So können neben BamHI auch noch andere Restriktionsenzymeschnittstellen zu Klonierungszwecken herangezogen werden, z.B. nach dem Schema

35

NotI-XbaI-SpeI-BamHI-SmaI-EcoRI-3' Ende ..... 5' Ende-SalI/HincII-BamHI  
**5' Deletionsfragment**

*Tab. 1: Zusammenstellung der durch Exonuklease III-Verdau hergestellten 5' Deletionsklone der Ub/S27a 5' untranslatierten Region*

5' Deletionsfragment	5' Ende des Fragmentes	3' Ende des Fragmentes
1612 bp	Position - 1501	Position + 111
806 bp	Position - 695	Position + 111
483 bp	Position - 372	Position + 111
272 bp	Position - 161	Position + 111
156 bp	Position - 45	Position + 111

5 Die Positionsangaben beziehen sich auf die Numerierung der in Abbildung 5 dargestellten genomischen Ub/S27a-Sequenz.

10 Alle Deletionsklone haben ein gemeinsames 3' Ende (Position + 111), das zwischen den Transkriptionsstartstellen und dem Startkodon liegt (Abb. 5). Das größte Fragment umfaßt 1.7 kb und das kleinste Fragment 150 bp (Tab.1). Letzteres ist das einzige Fragment, das nicht mehr die singuläre Sp1-Bindungsstelle enthält. Diese potentiellen Promotorregionen wurden in den eukaryontischen Expressionsvektor pBL-CAT6 vor das promotorloses CAT-Gen, das als Reportergen diente, kloniert und zur transienten Transfektion von serumkultivierten CHO-Zellen eingesetzt.

15

#### *DNA-vermittelte Zelltransfektion und CAT-Assay*

20 Am Vortag der Transfektion wurden  $2 \times 10^5$  Zellen pro 20 cm² Schale ausgesät. Die Zellen wurden mit 10 µg Plasmid-DNA (CAT-Reporterkonstrukte) und 500 ng des Plasmides pCMVtklacZ unter Verwendung einer modifizierten Calciumphosphat-Präzipitationsmethode transfiziert (Chen & Okayama, 1987). Die β-Galactosidase-Aktivität des Kontrollvektors pCMVtklacZ wurde dabei zur Bestimmung der Transfektionseffizienz herangezogen. Überschüssiges DNA-Präzipitat wurde nach 4stündiger Inkubation bei 37°C und 25 5% CO₂ durch Waschen mit PBS entfernt.

30 Nach einer Inkubationsperiode von 48 Stunden wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Danach wurde je 1 ml eiskalter NTE-Puffer (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.8, 1 mM EDTA) in die Schalen gegeben und die Zellen wurden mit Hilfe eines Schabers von den Schalen abgelöst und in Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden durch 3minütige Zentrifugation bei 9000 rpm pelletiert, in 70 µl 0.25 M Tris-HCl pH 7.8 resus-

pendiert und bei - 70°C gelagert. Für die Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität nach der Methode von Sleigh wurden jeweils 30 µl der Zellsuspension eingesetzt (Sleigh, 1986). Eine Normalisierung der relativen CAT-Aktivität jeder Transfektion wurde auf der Basis der nach der Methode von Norton und Coffin bestimmten β-Galactosidase-Aktivität vorgenommen (Norton & Coffin, 1985). Für diesen Test wurden jeweils 10 µl der Zellsuspension eingesetzt. In allen Fällen wurde außerdem eine Korrektur bezüglich der eingesetzten Proteinmenge vorgenommen. Die Proteinkonzentration wurde dabei nach der Bradford-Methode bestimmt (Ausubel et al., 1987).

In dem Histogramm in Abbildung 8 sind die Ergebnisse aus vier unabhängig voneinander durchgeföhrten transienten Expressionsexperimenten dargestellt. Zur Kontrolle wurden Plasmide eingesetzt, in denen die CAT-Genexpression durch einen konstitutiven viralen Promotor gesteuert wird. In pBL-CAT5 ist es der Thymidinkinasepromotor des Herpes simplex Virus. In pCMVtkCAT liegt dieser Promotor in Kombination mit einem Enhancer des humanen Cytomegalievirus vor und in pKSSV2CAT handelt es sich um den SV40-Promotor. pBL-CAT6 diente als Negativkontrolle und enthält ein promotorloses CAT-Gen.

Mit Ausnahme des 156 bp Fragmentes zeigten alle Ub/S27a-Fragmente, die in 5'-3' Orientierung vor das promotorlose CAT-Reportergen kloniert worden waren, eine starke Promotoraktivität, die 2.5 bis 3mal höher war als die des tk-Promotors des Herpes simplex Virus (Abb.8). Die stärkste Promotoraktivität, die mit der des SV40- Promotors in pKSSV2CAT vergleichbar war, wiesen dabei die Fragmente von 483 bp und 272 bp auf. Lediglich die virale CMV-Enhancer/tk-Promotor-Kombination in pCMVtkCAT resultierte in einer noch um ungefähr 10% höheren CAT-Aktivität. Bei einer bis zur Position - 45 reichenden Deletion (156 bp Fragment), die auch die singuläre Sp1-Bindungsstelle umfaßte, war keine CAT-Aktivität mehr feststellbar (Abb.8). Die Ub/S27a 5' untranslatierte Region, die für die Vermittlung einer starken Promotoraktivität ausreichend ist, läßt sich somit auf den Bereich von - 161, dem 5' Ende des 272 bp Fragmentes, bis - 45, dem 5' Ende des 156 bp Fragmentes, eingrenzen. Innerhalb dieses 117 bp umfassenden Bereiches liegt auch die singuläre Sp1-Bindungsstelle.

Ein unerwartetes Resultat war die Beobachtung, daß die kürzeren Fragmente auch in der 3'-5' Orientierung eine Promotoraktivität aufwiesen (Abb.8). Allerdings ist dieser auf dem Gegenstrang lokalisierte Promotor nicht so stark wie der Ub/S27a-Promotor, sondern um 42% reduziert. Auch hier zeigten die Fragmente von 483 bp und 272 bp die größte Aktivität. Diese Aktivität war mit der des tk-Promotors in pBL-CAT5 vergleichbar. Das zugehörige Gen, dessen Expression von diesem Gegenstrangpromotor aus gesteuert wird, konn-

te bisher noch nicht identifiziert werden. Es könnte sich also bei dem oben erwähnten 117 bp Promotorbereich sogar um eine bidirektionale Promotorregion handeln.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß mit dem von den Erfindern der vorliegenden Erfindung isolierten Ub/S27a-Promotor aus CHO-Zellen erstmals ein sehr starker konstitutiver homologer Promotor des Hamsters bereitgestellt wird. Untersuchungen an stabil transfizierten serumkultivierten CHO-Zellen belegen, daß der Ub/S27a-Promotor auch nach der Integration in das Zellgenom äußerst aktiv ist und für eine sehr starke Expression des CAT-Reportergenes sorgt.

10

*Beispiel 5: Transiente Expression eines Reportergens unter der Kontrolle des Ub/S27a-Promotors in BHK-Zellen*

CAT-Reporterkonstrukte, die verschiedene Fragmente der Ub/S27a-Promotorregion enthielten, wurden analog in BHK-21-Zellen (ATCC CCL 10) eingebracht und die CAT-Aktivität der Transfektanten gemessen. Abb. 9 zeigt, daß mit den erfundungsgemäßen Promotorsequenzen auch in BHK-Zellen eine außerordentlich hohe Expressionsrate erzielt werden kann.

20

*Beispiel 6: Stabile Expression eines Reportergens unter der Kontrolle des Ub/S27a-Promotors in CHO-Zellen*

Stabile Transfektanten wurden wie folgt hergestellt. Am Vortag der Transfektion wurden 200.000 Zellen pro 20-cm²-Schale ausgesät. Die Zellen wurden mit 10 µg Plasmid-DNA (CAT-Reporterkonstrukte) und 500 ng des Plasmides pSV2pac (Vara *et al.*, 1986) unter Verwendung einer modifizierten Calciumphosphat-Präzipitationsmethode transfiziert (Chen & Okayama, 1987). Das Plasmid pSV2pac trägt das für die Puromycin-N-Acetyltransferase (pac) kodierende Gen und vermittelt somit Resistenz gegen das die Proteinbiosynthese hemmende Antibiotikum. Überschüssiges DNA-Präzipitat wurde nach 4stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ durch Waschen mit PBS entfernt. Nach 24 weiteren Stunden wurde mit der Selektion der Transfektanten durch Zugabe von 10 µg/ml Puromycin gestartet. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel mit Puromycin-haltigem Medium. Über Verdünnungsklonierung der selektierten Transfektanten wurden Einzelzellklone gewonnen.

Abb. 10-12 zeigen CAT-Expressionsraten verschiedener Klone stabiler Transfektanten relativ zu pCMVtkCAT cl.6 (Klon 6, der pCMVtkCAT-transfizierte Zellklon mit der höchsten CAT-Aktivität).

5

### Literatur

Adams, S.M., Sharp, M.G., Walker, R.A., Brammar, W.J. & Varley, J.M. (1992)  
10 Differential expression of translation-associated genes in benign and malignant human breast tumours  
Br.J.Cancer 65, 65 - 71

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Smith, J.A., Seidman, J.G. &  
15 Struhl, K. (1987)  
Current protocols in molecular biology  
Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience

Baker, R.T. & Board, P.G. (1991)  
20 The human ubiquitin-52 amino acid fusion protein gene shares several structural features with mammalian ribosomal protein genes  
Nucleic Acids Research 19, 1035 - 1040

Boshart, M., Klüppel, M., Schmidt, A., Schütz, G. & Luckow, B. (1992)  
25 Reporter constructs with low background activity utilizing the cat gene  
Gene 110, 129 - 130

Breathnach, R. & Chambon, P. (1981)  
Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins  
30 Ann.Rev.Biochem. 50, 349 - 383

Chen, C. & Okayama, H. (1987)  
High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA  
J. Mol. Cell. Biol. 7, 2745 - 2752

Ciechanover, A. (1994)  
35 The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway  
Cell 79, 13 - 21

Dynan, W.S. & Tjian, R. (1983)  
The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40  
early promoter  
5 Cell 35, 79 - 87

Faisst, S. & Meyer, S. (1992)  
Compilation of vertebrate-encoded transcription factors  
Nucleic Acids Research 20, 3 - 26

Finley, D., Bartel, B. & Varshavsky, A. (1989)  
The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates  
ribosome biogenesis  
Nature 333, 394 - 401

Fornace, A.J., Alama, I., Hollander, M.C. & Lamoreaux, E. (1989)  
Ubiquitin mRNA is a major stress-induced transcript in mammalian cells  
Nucleic Acids Research 17, 1215 - 1230

Huxley, C. & Fried, M. (1990)  
The mouse rpL7a gene is typical of other ribosomal protein genes in its 5' region but dif-  
fers in being located in a tight cluster of CpG-rich islands  
Nucleic Acids Research 18, 5353 - 5357

Jentsch, S., Seufert, W. & Hauser, H.-P. (1991)  
Genetic analysis of the ubiquitin system  
Biochimica et Biophysica Acta 1089, 127 - 139

Kaufman R. J. (1987)  
High level production of proteins in mammalian cells  
In: Genetic Engineering: Principles and methods (Hrsg. J K Setlow), Bd. 9, S. 155  
Plenum Publishing, New York

Luckow, B., Schütz, G. (1987)  
CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of  
eucaryotic promoters and regulatory elements  
Nucleic Acids Res. 15, 5490

Luo, X. & Kim, K.-H. (1990)  
An enhancer element in the house-keeping promoter for acetyl-CoA carboxylase gene  
Nucleic Acids Research 18, 3249 - 3254

5 Meyer, J., Nick, S., Stamminger, T., Grummt, F., Jahn, G. & Lipps, H.J. (1993)  
Inhibition of HIV-1 replication by a high-copy-number vector expressing antisense RNA for  
reverse transcriptase  
Gene 129, 263 - 268

10 Nicolaides, N.C. & Stoeckert, C.J. (1990)  
A simple, efficient method for the separate isolation of RNA and DNA from the same cells  
BioTechniques 8, 154 - 155

15 Norton, P.A. & Coffin, J.M. (1985)  
Bacterial  $\beta$ -galactosidase as a marker of Rous Sarcoma virus gene expression and replication  
Mol. Cell. Biol. 5, 281 - 290

20 Redman, K.L. & Rechsteiner, M. (1989)  
Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a  
Nature 338, 438 - 440

25 Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989)  
Molecular cloning: A Laboratory Manual  
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

30 Schlesinger, M.J. & Bond, U. (1987)  
Ubiquitin genes  
Oxf. Survey Euk. Genes 4, 77 - 91

Shimbara, N., Sato, C., Takashina, M., Tanaka, T., Tanaka, K. & Ichihara, A. (1993)  
Down-regulation of ubiquitin gene expression during differentiation of human leukemia cells  
FEBS Letters 322, 235 - 239

35 Sleigh, M.J. (1986)  
A nonchromatographic assay for expression of the chloramphenicol acetyl transferase gene  
in eukaryotic cells  
Anal. Biochem. 156, 252 - 256

Urlaub, G. & Chasin, L.A. (1980)  
Isolation of chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216 - 4220

5 Tsonis, P.A., Manes, T., Millan, J.L. & Goetinck, P.F. (1988)  
CAT constructs with convenient sites for cloning and generating deletions  
Nucleic Acids Research 16, 7745

10 Vara, J.A., Portela, A., Ortín, J. & Jiménez, A. (1986)  
Expression in mammalian cells of a gene from Streptomyces alboniger conferring puromycin resistance  
Nucleic Acids Research 14, 4617 - 4624

15 Wegner, M., Zastrow, G., Klavinius, A., Schwender, S., Müller, F., Luksza, H., Hoppe, J., Wienberg , J. & Grummt, F. (1989)  
Cis-acting sequences from mouse rDNA promote plasmid DNA amplification and persistence in mouse cells: implication of HMG-I in their function  
Nucleic Acids Research 17, 9909 - 9932

20 Wiborg, O., Pedersen, M.S., Wind, A., Berglund, L.E., Marcker, K.A. & Vuust, J. (1985)  
The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences  
EMBO J. 4, 755 - 759

25 Wong, J.M., Mafune, K., Yow, H., Rivers, E.N., Ravikumar, T.S., Steele, G.D. & Chen, L.B. (1993)  
Ubiquitin-ribosomal protein S27a gene overexpressed in human colorectal carcinoma is an early growth response gene  
30 Cancer Research 53, 1916 - 1920

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Boehringer Ingelheim International GmbH
- (B) STRASSE: Binger Str.
- (C) ORT: Ingelheim
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 55216
- (G) TELEFON: 06132-772770
- (H) TELEFAX: 06132-774377

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Starker homologer Promotor aus Hamster

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 8

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 508 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: beides

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

TGGAACCGCC GCCAAGATGC AGATTTTCGT GAAGACCCTT ACGGGGAAAA CGATCACGCT 60  
CGAGGTTGAA CCCTCGGACA CTATAGAAAA TGTAAAGGCC AAGATCCAGG ATAAGGAAGG 120  
AATTCCCTCCT GACCAGCAGA GGCTGATCTT TGCTGGTAAG CAACTGGAAG ATGCCGTAC 180  
TTTGTCTGAC TACAACATCC AAAAGGAGTC CACCCTTCAT CTTGTGTTGA GACTTCGTGG 240  
TGGTGCTAAG AAGAGGAAGA AGAAGTCCTA CACCACTCCC AAGAAGAATA AGCATAAGAG 300  
AAAGAAGGTT AAGTTGGCTG TGCTGAAGTA CTATAAGGTG GATGAAAATG GCAAAATTAG 360  
TCGCCTTCGT CGAGAGTGTC CATCTGATGA GTGTGGTGCT GGAGTTTCA TGGCTAGCCA 420  
TTTGACAGA CATTACTGTG GCAAGTGTG TCTGACTTAC TGCTTCAACA AACCAAGAAGA 480  
CAAGTAGTTG TGTATGAATA AATAAAAAA 508

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 487 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: beides
  - (D) TOPOLOGIE: beides
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

TGGAGCCGCA ACCAAAATGC AGATTTCGT GAAAACCCTT ACAGGGAAAGA CCATCACCCCT 60  
CGAGGTTGAA CCCTCGGATA CGATAGAAAA TGTAAGGCC AAGATCCAGG ATAAGGAAGG 120  
AATTCCCTCCT GATCAGCAGA GACTGATCTT TGCTGGCAAG CAGCTAGAAG ATGGACGTAC 180  
TTTGTCTGAC TACAATATTC AAAAGGAGTC TACTCTTCAT CTTGTGTTGA GACTTCGTGG 240  
TGGTGCTAAG AAAAGGAAGA AGAAGTCTTA CACCACTCCC AAGAAGAATA AGCACAAAGAG 300  
AAAGAAGGTT AAGCTGGCTG TCCTGAAATA TTATAAGGTG GATGAGAATG GCAAAATTAG 360  
TCGCCTTCGT CGAGAGTGCC CTTCTGATGA ATGTGGTGCT GGGGTGTTA TGGCAAGTCA 420  
CTTGACAGA CATTATTGTG GCAAATGTTG TCTGACTTAC TGTTTCAACA AACCAAGAAGA 480  
CAAGTAA 487

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 156 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu  
1 5 10 15  
Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp  
20 25 30  
Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys

28

35

40

45

Gln	Leu	Glu	Asp	Gly	Arg	Thr	Leu	Ser	Asp	Tyr	Asn	Ile	Gln	Lys	Glu
50							55					60			
Ser	Thr	Leu	His	Leu	Val	Leu	Arg	Leu	Arg	Gly	Gly	Ala	Lys	Lys	Arg
65					70				75			80			
Lys	Lys	Lys	Ser	Tyr	Thr	Thr	Pro	Lys	Lys	Asn	Lys	His	Lys	Arg	Lys
					85			90			95				
Lys	Val	Lys	Leu	Ala	Val	Leu	Lys	Tyr	Tyr	Lys	Val	Asp	Glu	Asn	Gly
					100			105			110				
Lys	Ile	Ser	Arg	Leu	Arg	Arg	Glu	Cys	Pro	Ser	Asp	Glu	Cys	Gly	Ala
					115			120			125				
Gly	Val	Phe	Met	Ala	Ser	His	Phe	Asp	Arg	His	Tyr	Cys	Gly	Lys	Cys
					130			135			140				
Cys	Leu	Thr	Tyr	Cys	Phe	Asn	Lys	Pro	Glu	Asp	Lys				
					145		150			155					

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 156 Aminos „uren
- (B) ART: Aminos „ure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met	Gln	Ile	Phe	Val	Lys	Thr	Leu	Thr	Gly	Lys	Thr	Ile	Thr	Leu	Glu
1					5			10			15				
Val	Glu	Pro	Ser	Asp	Thr	Ile	Glu	Asn	Val	Lys	Ala	Lys	Ile	Gln	Asp
					20			25			30				
Lys	Glu	Gly	Ile	Pro	Pro	Asp	Gln	Gln	Arg	Leu	Ile	Phe	Ala	Gly	Lys
					35			40			45				
Gln	Leu	Glu	Asp	Gly	Arg	Thr	Leu	Ser	Asp	Tyr	Asn	Ile	Gln	Lys	Glu
					50			55			60				
Ser	Thr	Leu	His	Leu	Val	Leu	Arg	Leu	Arg	Gly	Gly	Ala	Lys	Lys	Arg
					65			70			75			80	
Lys	Lys	Lys	Ser	Tyr	Thr	Thr	Pro	Lys	Lys	Asn	Lys	His	Lys	Arg	Lys
					85			90			95				
Lys	Val	Lys	Leu	Ala	Val	Leu	Lys	Tyr	Tyr	Lys	Val	Asp	Glu	Asn	Gly

100

105

110

Lys	Ile	Ser	Arg	Leu	Arg	Arg	Glu	Cys	Pro	Ser	Asp	Glu	Cys	Gly	Ala
							115					120			125
Gly	Val	Phe	Met	Ala	Ser	His	Phe	Asp	Arg	His	Tyr	Cys	Gly	Lys	Cys
							130				135			140	
Cys	Leu	Thr	Tyr	Cys	Phe	Asn	Lys	Pro	Glu	Asp	Lys				
							145				150			155	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2529 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GATCTCCAGG ACAGCCATGG CTATTACACA GAGAAACCCT GTCTGGAAAA ACAAAAAATT 60  
AGTGTCCATG TGTAAATGTG TGGAGTATGC TTGTCATGCC ACATACAGAG GTAGAGGGCA 120  
GTTTATGGGA GTCAGTTCCCT ATTCTTCCTT TATGGGGGAC CTGGGGACTG AACTCAGGTC 180  
ATCAGGCTTG GCAGAAAAGTG CATTAGCTCA CGGAGCCTTA TCATTGGCGA AAGCTCTCTC 240  
AAGTAGAAAA TCAATGTGTT TGCTCATAGT GCAATCATT A TGTTTCGAGA GGGGAAGGGT 300  
ACAATCGTTG GGGCATGTGT GGTACACATCT GAATAGCAGT AGCTCCCTAG GAGAATTCCA 360  
AGTTCTTGG TGGTGTATCA ATGCCCTTAA AGGGGTCAAC AACTTTTTT CCCTCTGACA 420  
AAACTATCTT CTTATGTCCT TGTCCCTCAT ATTTGAAGTA TTTTATTCTT TGCAGTGTG 480  
AATATCAATT CTAGCACCTC AGACATGTTA GGTAAGTACC CTACAACTCA GTTAACTAA 540  
TTTAATTAA CTAATTAAAC CCCAACACTT TTTCTTGTT TATCCACATT TGTGGAGTGT 600  
GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGC 660  
CGCGCGCGCT CGGATCATTAC TACCTTTGT TTAAAAAAATG TTAGTCCAGG GGTGGGGTGC 720  
ACTGTGAAAG TCTGAGGGTA ACTTGCTGGG GTCAAGTTCTT TCCACTATAG GACAGAACTC 780  
CAGGTGTCAA CTCTTTACTG ACAGAACCAT CCAAATAGCC CTATCTAATT TTAGTTTTT 840  
ATTTATTAAAT TTTTGTGTTT TCGAGACAGG GTTTCTCTGT GGCTTTGGAG GCTGTCCTGG 900  
AACTAGCTCT TGTAGACCAG GCTGGTCTCG AACTCAGAGA TCCACCTGCC TCTGCCTCCT 960

GAGTGCTGGG ATTAAAGGCA TGCGCCACCA ACGCTTGGCT CTACCTAATT TTAAAAGAGA 1020  
TTGTGTGTCA CAAGGGTGTCA ATGTCGCCCT GCAACCACCC CCCCCCCTAA AAAAAGAAAA 1080  
AAAAACTTCA CTGAAGCTGA AGCACGATGA TTTGGTTACT CTGGCTGGCC AATGAGCTCT 1140  
AGGGAGTCTC CTGTCAAACA GAATCTCAAC AGGCGCAGCA GTCTTTTA AAGTGGGTT 1200  
ACAACACAGG TTTTGCATA TCAGGCATT TATCTAAGCT ATTTCCCAGC CAAAAATGTG 1260  
TATTTGGAG GCAGCAGAGC TAATAGATTA AAATGAGGGA AGAGCCCACA CAGGTTATT 1320  
GGAAGATAAG CATCTTCTTT ATATAAAACA AAACCAAACC AAACTGGAGG AGGTCTACCT 1380  
TTAGGGATGG AAGAAAAGAC ATTTAGAGGG TGCAATAGAA AGGGCACTGA GTTTGTGAGG 1440  
TGGAGGACTG GGAGAGGGCG CAACCGCTTT AACTGTCCCTG TTTTGCCTAT TTTTGGGGA 1500  
CAGCACATGT TCCTATTTT CCCAGGATGG GCAATCTCCA CGTCCAAACT TGCGGTCGAG 1560  
GACTACAGTC ATTTGCAGG TTTCTTACT GTATGGCTTT TAAAACGTGC AAAGGTGACC 1620  
ATTAACCGTT TCACGCTGGG AGGGCACGTG CGGCTCAGAT GCTTCCTCTG ACTGAGGGCC 1680  
AGGAGGGGGC TACACGGAAG AGGCCACACC CGCACTTGGG AAGACTCGAT TTGGGCTTCA 1740  
GCTGGCTGAG ACGCCCCAGC AGGCTCCTCG GCTACACCTT CAGCCCCGAA TGCCTTCCGG 1800  
CCCATAACCC TTCCCTTCTA GGCATTTCCG GCGAGGACCC ACCCTCGCGC CAAACATTG 1860  
GCCCATCCCC CCGGTCTCA CCTGAATCTC TAACTCTGGA CTCCAGAGTT TAGAGACTAT 1920  
AACCAAGATAG CCCGGATGTG TGGAACTGCA TCTTGGGACG AGTAGTTTA GCAAAAAGAA 1980  
AGCGACGAAA AACTACAATT CCCAGACAGA CTTGTGTTAC CTCTCTTCTC ATGCTAAACA 2040  
AGCCCCCTTT AAAGGAAAGC CCCTCTTAGT CGCATCGACT GTGTAAGAAA GGCGTTGAA 2100  
ACATTTAAT GTTGGGCACA CCGTTTCGAG GACCGAAATG AGAAAGAGCA TAGGGAAACG 2160  
GAGCGCCCGA GCTAGTCTGG CACTGCGTTA GACAGCCCG CGCGTTGCAG CGGGCAGGCA 2220  
CTTGCCTGGA CGCCAAGGGG CGGGCTTTGAG GACCGAAATG AGAAAGAGCA TAGGGAAACG 2280  
CTTCCTTCC GATCCGCCAT CCGTGGTGAG TGTGTGCTGC GGGCTGCCGC TCCGGCTTGG 2340  
GGCTTCCCGC GTCGCTCTCA CCCTGGTCGG CGGCTCTAAT CCGTCTCTT TCGAATGTAG 2400  
GTGGAACCGC CGCCAAGATG CAGATTTCG TGAAGACCCCT TACGGGGAAA ACGATCACGC 2460  
TCGAGGTACG AACCAAGGTGG CGTGAGAAGC GAAGGCCTGC CAGAGGCCCT CTATGCTCGC 2520  
TTAAAGCTT

2529

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 117 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: beides  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

AGGACCGAAA TGAGAAAGAG CATAGGGAAA CGGAGCGCCC GAGCTAGTCT GGCAC TGC GT 60  
TAGACAGCCG CGGTGTTGC AGCGGGCAGG CACTTGCGTG GACGCCAAGG GGCGGGT 117

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GTTGGTGTAGG ACTTCTTCTT C 21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleins „ure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

CTCGAGCGTG ATCGTTTCC 20

*Patentansprüche*

1. Nukleinsäuremolekül, das Promotorsequenzen und/oder andere regulatorische Sequenzen des Ubiquitin-S27a-Gens enthält.  
5
2. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei die Promotorsequenzen und/oder anderen regulatorischen Sequenzen aus dem Ubiquitin-S27a-Gen des Hamsters abgeleitet sind.  
10
3. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die Promotorsequenzen und/oder anderen regulatorischen Sequenzen in der Sequenz gemäß Abb. 5 enthalten sind.  
15
4. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 3, wobei die Promotorsequenzen in der Sequenz enthalten sind, die den Positionen -161 bis -45 gemäß Abb. 5 entspricht.  
20
5. Nukleinsäuremolekül, das eine Promotorsequenz enthält, die aus der Sequenz gemäß Abb. 5 durch Substitution, Insertion oder Deletion von einer, zwei, drei oder mehr Basen ableitbar ist, ohne daß durch diese Substitution, Insertion oder Deletion die Promotoraktivität deutlich erniedrigt wird.  
25
6. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es einen oder mehrere Enhancer enthält, der/die mit der Promotorsequenz funktionell verknüpft ist/sind.  
30
7. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß es regulatorische Sequenzen enthält, über die die Transkriptionsaktivität der Promotorsequenz reguliert werden kann.  
35
8. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Promotorsequenzen und/oder regulatorischen Sequenzen mit einem Gen funktionell verknüpft sind.
9. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen für Gewebeplasminogenaktivator, *second-generation*-Gewebeplasminogenaktivator, Interferon, Tumornekrosefaktor, Erythropoietin, Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor, Mangan-Superoxiddismutase, eine Immunglobulinkette, die variable Region einer Immunglobulinkette, eine humanisierte Immunglobulinkette, die variable Region einer humanisierten

Immunglobulinkette, einen single-chain-Antikörper und/oder einen Antikörper, der für variantes CD44 spezifisch ist, kodiert.

10. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet,  
5 daß es ein Expressionsvektor ist.

11. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet,  
dadurch gekennzeichnet, daß der Promotor durch Rekombination in das Genom von eukaryontischen Wirtszellen,  
10 vorzugsweise Hamsterzellen, besonders bevorzugt CHO-Zellen, integriert werden kann.

12. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet,  
daß es eine amplifikationsfördernde Sequenz enthält.

13. Wirtszelle, in die ein Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 12  
15 eingeführt wurde.

14. Wirtszelle, in die ein Nukleinsäuremolekül eingeführt wurde, das das Gen für ein heterologes Genprodukt in Verknüpfung mit dem Promotor des Hamster-Ub/S27a-Gens enthält.

20 15. Verfahren zur Herstellung eines heterologen Genprodukts in einer eukaryontischen Wirtszelle, vorzugsweise einer Hamsterzelle, besonders bevorzugt einer CHO-Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 in die eukaryontische Wirtszelle eingeführt wird, die Wirtszelle kultiviert und das 25 synthetisierte Genprodukt isoliert wird.

30 16. Verfahren zur Herstellung eines heterologen Genprodukts in einer eukaryontischen Wirtszelle, vorzugsweise einer Hamsterzelle, besonders bevorzugt einer CHO-Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß das heterologe Genprodukt unter der Kontrolle von Promotorsequenzen und/oder regulatorischen Sequenzen des Ubiquitin-S27a-Gens exprimiert wird.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Promotorsequenzen und/ oder regulatorischen Sequenzen in der Abb. 5 enthalten sind.

35 18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Promotorsequenzen in der Sequenz enthalten sind, die den Positionen -161 bis -45 gemäß Abb. 5 entspricht.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß das heterologe Gen für Gewebeplasminogenaktivator, *second-generation*-Gewebeplasminogenaktivator, Interferon, Tumornekrosefaktor, Erythropoietin, Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor, Mangan-Superoxiddismutase, eine Immunglobulinkette, die variable Region einer Immunglobulinkette, eine humanisierte Immunglobulinkette, die variable Region einer humanisierten Immunglobulinkette, einen single-chain-Antikörper und/oder einen Antikörper, der für variantes CD44 spezifisch ist, kodiert.

10 20. Starker homologer Promotor des Hamsters.

21. Promotor nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Transkriptionsaktivität aufweist, die größer ist als diejenige des Thymidinkinasepromotors aus *Herpes simplex*.

15 22. Promotor nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Transkriptionsaktivität aufweist, die mindestens in der gleichen Größenordnung liegt wie diejenige des SV40-Promotors.

20 23. Promotor nach einem der Ansprüche 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens eines der Merkmale: GC-reicher Sequenzbereich, Sp1-Bindungsstelle, Polypyrimidinelement, Abwesenheit einer CAAT-Box, Abwesenheit einer TATA-Box aufweist.

25 24. Promotor nach einem der Ansprüche 20 bis 23, dadurch gekennzeichnet daß er eine Sp1-Bindungsstelle, aber keine TATA-Box aufweist.

25 25. Promotor nach einem der Ansprüche 21 bis 24, dadurch gekennzeichnet daß der in der Sequenz gemäß Abb. 5 enthalten ist.

30 26. Promotor nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet daß er in der Sequenz enthalten ist, die den Positionen -161 bis -45 gemäß Abb. 5 entspricht.

35 27. Verfahren zur Expression eines heterologen Genprodukts in Hamsterzellen, vorzugsweise CHO-Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß das Genprodukt unter der Kontrolle eines Promotors gemäß einem der Ansprüche 21 bis 26 exprimiert wird.

28. Verwendung eines Promotors nach einem der vorangegangenen Ansprüche zur Herstellung eines heterologen Genprodukts in Hamsterzellen, vorzugsweise CHO-Zellen.

29. Ub/S27a-Gen aus Hamster.

30. Ub/S27a-Gen nach Anspruch 29 mit der Sequenz gemäß Abb. 1 oder einer Sequenz, die unter stringenten Bedingungen mit einem Nukleinsäuremolekül mit der Sequenz gemäß Abb. 1 hybridisiert.

1/14

Mensch	TGGAGCCGCAACCAAATGCAGATTTCGTGAAAACCCTTACGGGAAGACCATCACCT	82
CHO	TGGAACCGCCCAAGATGCAGATTTCGTGAAAGACCCCTTACGGGAAACGATCACGCT :::	60
Mensch	CGAGGTTGAACCCCTCGGATACGATAGAAAATGTAAGGCCAAGATCCAGGATAAGGAAGG	142
CHO	CGAGGTTGAACCCCTCGGACACTATAGAAAATGTAAGGCCAAGATCCAGGATAAGGAAGG	120
Mensch	AATTCCCTCCTGATCAGCAGAGACTGATCTTGCTGGCAAGCAGCTAGAACGATGGACGTAC	202
CHO	AATTCCCTCCTGACCAGCAGAGGCTGATCTTGCTGGTAAGCACTGGAAAGATGGCCGTAC	180
Mensch	TTTGTCTGACTACAATATTCAAAGGAGTCTACTCTTCATCTTGTGAGACTTCGTGG	262
CHO	TTTGTCTGACTACAACATCCAAAAGGAGTCCACCCCTTCATCTTGTGAGACTTCGTGG	240
Mensch	TGGTGCTAAGAAAAGGAAGAAGAAGTCTTACACCACTCCCAAGAACATAAGCACAAGAG	322
CHO	TGGTGCTAAGAAGAGGAAGAAGAACGACTTACACCACTCCCAAGAACATAAGCATAAGAG	300
Mensch	AAAGAAGGTTAACGCTGGCTGTCTGAAATATTATAAGGTGGATGAGAACGGAAAATTAG	382
CHO	AAAGAAGGTTAACGCTGGCTGTCTGAAAGTACTATAAGGTGGATGAAATGGAAAATTAG	360
Mensch	TCGCCCTCGTCGAGAGTGCCTCTGATGAATGTGGTCTGGGTGTTTATGGCAAGTCA	442
CHO	TCGCCCTCGTCGAGAGTGTCCATCTGATGAGTGTGGTCTGGAGTTTATGGCTAGCCA	420
Mensch	CTTGACAGACATTATTGTGGCAAATGTTGCTGACTTACTGTTCAACAAACCAGAAGA	502
CHO	CTTGACAGACATTACTGTGGCAAGTGTGCTGACTTACTGTTCAACAAACCAGAAGA	480
Mensch	*** CAAGTAA *****	509
CHO	CAAGTACTTGTATGAATAATAAAAA	508

92.2% Homologie

____ Poly A Signal      ::: Startkodon      *** Stoppkodon

*Abb. 1*

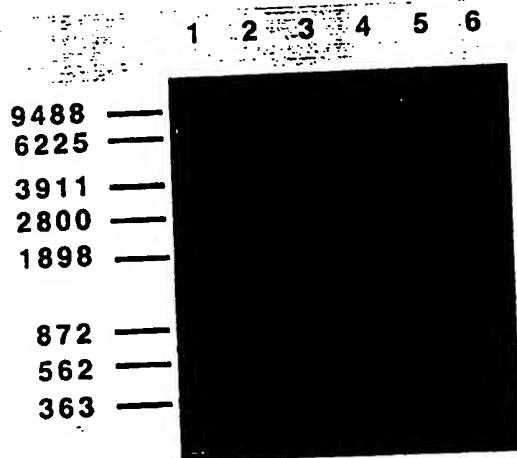
2/14

Mensch	<u>MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEG</u>	35
CHO	<u>MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEG</u>	35
Mensch	<u>I PPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLS DYN I QKE STLHL V</u>	70
CHO	<u>I PPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLS DYN I QKE STLHL V</u>	70
Mensch	<u>LRLRGGA KKRKKSYTTPKKNKHKRKKVKLAVLKY</u>	105
CHO	<u>LRLRGGA KKRKKSYTTPKKNKHKRKKVKLAVLKY</u>	105
Mensch	<u>YKVDENGKISRLRRECP SDEC GAGVFMASHFDRHY</u>	140
CHO	<u>YKVDENGKISRLRRECP SDEC GAGVFMASHFDRHY</u>	140
Mensch	<u>CGKCCLTYCFNKPEDK</u>	156
CHO	<u>CGKCCLTYCFNKPEDK</u>	156

100% Homologie

*Abb. 2*

3/14



*Abb. 3*

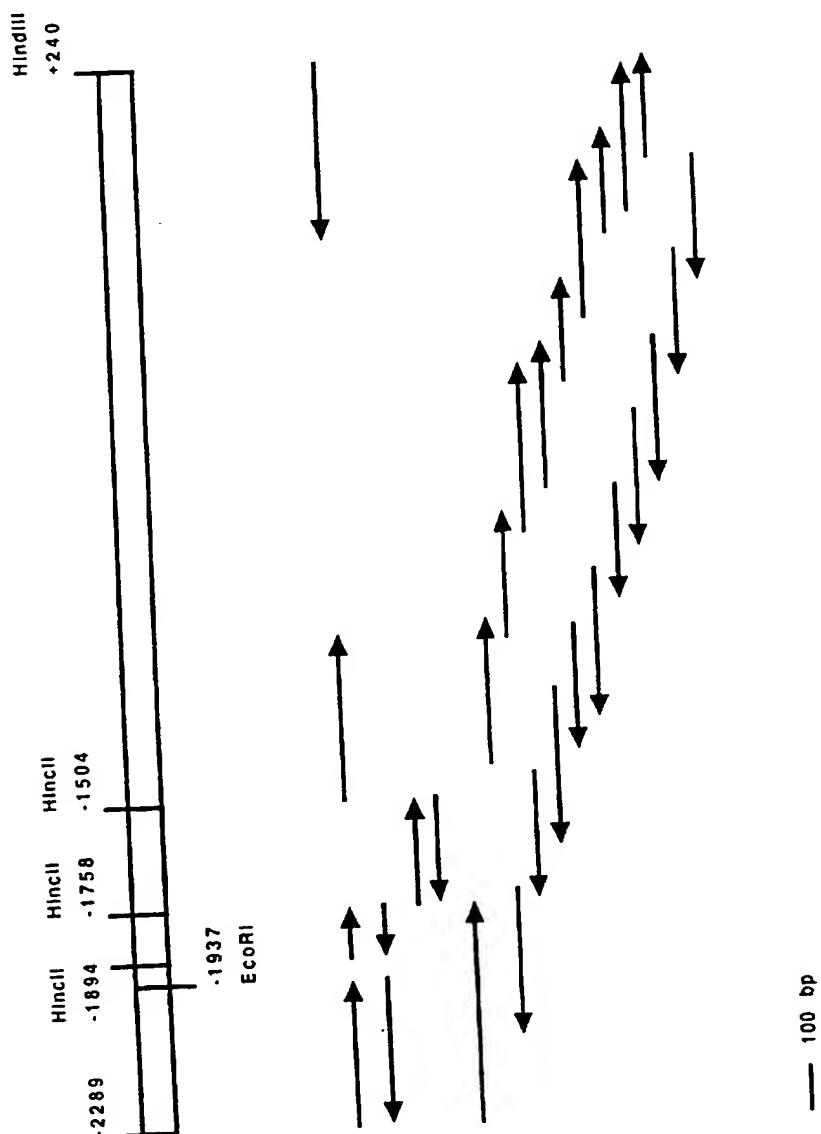


Abb. 4

5/14

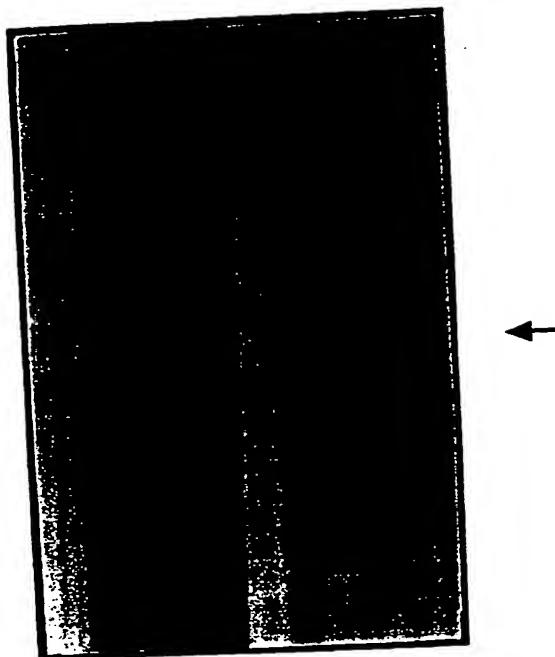
GATCTCCAGGACAGCCATGGCTATTACACAGAGAAACCCTGTCTGGAAAAA	- 2240
ACAAAAAAATTAGTGTCCATGTGTAAATGTGTGGAGTATGCTGTCACTGCC	- 2190
ACATACAGAGGTAGAGGGCAGTTATGGGAGTCAGTCCTATTCTCCCTT	- 2140
TATGGGGGACCTGGGGACTGAACTCAGGTCACTCAGGCTTGGCAGAAAGTG	- 2090
CATTAGCTCACGGAGCCTTATCATGGCAGAAAGCTCTCAAGTAGAAAAA	- 2040
TCAATGTGTGCTCATAGTCAATCATTATGTTGAGAGGGGAAGGGT	- 1990
ACAATCGTTGGGCATGTGTGGTCACATCTGAATAGCAGTAGCTCCCTAG	- 1940
<u>GAGAATTCCAAGTCTTGGTGGTATCAATGCCCTAAAGGGGTCAAC</u>	- 1890
EcoRI	HincII
AACTTTTTTCCCTCTGACAAAACATCTTCTTATGTCCTTGTCCCTCAT	- 1840
ATTTGAAGTATTITATTCTTGCAGTGTGAATATCAATTCTAGCACCTC	- 1790
AGACATGTTAGGTAAGTACCCCTACAACTCAGGTTAACTAATTAAATTAA	- 1740
HincII	
CTAATTAAACCCAAACACTTTCTTGTATCCACATTGTGGAGTGT	- 1690
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT	- 1640
GTGTGTGTGCCGCGCGCTCGGATCATTCTACCTTTGTITAAAAATG	- 1590
TTAGTCCAGGGGTGGGGTGCAGTGTGAAAGTCTGAGGGTAACTTGCTGG	- 1540
-> 1612 bp	
GTCAGTTCTTCCACTATAGGACAGA ^CTCCAGGTGTCAACTCTTACTG	- 1490
HincII	
ACAGAACCATCCAAATAGCCCTATCTAATTAGTTTTTATTTATTTAT	- 1440
*****	
TTTTTGTTTTCGAGACAGGGTTCTCTGTGGCTTGGAGGCTGTCCCTGG	- 1390
*****	
AACTAGCTTGTAGACCAGGCTGGTCTGAACTCAGAGATCCACCTGCC	- 1340
TCTGCCTCTGAGTGTGGATTAAAGGCATGCCACCAACGCTTGGCT	- 1290
CTACCTAATTAAAAGAGATTGTGTGTACAAGGGTGTCACTGTCGCCCT	- 1240
GCAACCACCCCCCCCCCAAAAAAAAAAAACTCACTGAAGCTGA	- 1190
AGCACGATGATTGGTTACTCTGGCTGGCCAATGAGCTCTAGGGAGTCTC	- 1140
CTGTCAAACAGAACTCAACAGGCGCAGCAGTCTTTAAAGTGGGGTT	- 1090
ACAACACAGTTTGCAATATCAGGCATTATCTAAGCTATTCCCAGC	- 1040
CAAAATGTGTATTGGAGGAGCAGCAGAGCTAATAGATTAAAGGGAA	- 990
AGAGCCCACACAGGTATTAGGAAGATAAGCATCTCTTATATAAAAACA	- 940
AAACCAACCAAACCTGGAGGAGGTCTACCTTTAGGGATGGAAGAAAGAC	- 890
ATTTAGAGGGTGCAATAGAAAGGGCACTGAGTTGTGAGGTGGAGGACTG	- 840
GGAGAGGGCGCAACCGCTTAACTGTCCCTGTTGCCTATTGTTGGGGAA	- 790

6/14

CAGCACATGTCTCTATTTCAGGATGGCAATCTCCACGTCCAAACT	-	740
-> 806 bp		
TGGGTCGAGGACTACAGTCATTTGCAGGTTCTTACTGTATGGCTTT	-	690
TAAAACGTGCAAAGGTGACCATAACCGTTACGCTGGGAGGGCACGTG	-	640
CGGCTCAGATGCTTCTCTGACTGAGGGCCAGGAGGGGCTACACGGAAG	-	590
AGGCCACACCCGCACTGGAAAGACTCGATTGGCTTCAGCTGGCTGAG	-	540
ACGCCCCAGCAGGCTCTCGGCTACACCTTCAGCCCCGAATGCCCTCCGG	-	490
CCCATAACCTTCCCTCTAGGCATTTCCGGCAGGACCCACCCCTCGCGC	-	440
CAAACATTGGCCCCATCCCCCGGTCTCACCTGAATCTTAACCTCTGGA	-	390
-> 483 bp		
CTCCAGAGTTAGAGACTATAACCAGATAGCCGGATGTGTGAACTGCA	-	340
TCTTGGGACGAGTAGTTTAGCAAAAAGAAAGCGACGAAAAACTACAATT	-	290
CCCAGACAGACTTGTTACCTCTCTCATGCTAAACAAGCCCCCTTT	-	240
AAAGGAAAGCCCCTTTAGTCGCATCGACTGTGTAAGAAAGGCCTTGAA	-	190
-> 272 bp		
ACATTTAATGTTGGGACACCGTTTCGAGGACCGAAATGAGAAAGAGCA	-	140
TAGGGAAACGGAGCGCCCGAGCTAGTCTGGCACTGCGTTAGACAG <u>CCCG</u>	-	90
SacII		
-> 156 bp		
GTCGTTGCAGCGGGCAGGCACTTGCCTGGACGCCAAGGGCGGGCTTTC	-	40
>>>>		
<u>GGCCGGGAAGCCCCGTTGGTCCGCGCGCTCTCCCTTCCGATCCGCCAT</u>	+	11
EagI		
+13		
CCGTGGTGAGTGTGTGCTGCCGCTCCGGCTGGGGCTTCCCGC	+	61
" "		
+85		
GTCGCTCTCACCTGGTCGGCGCTCTAATCCGTCTCTTCGAATGTAG	+	111
*		
:::		
GTGGAACCGCCGCAAGATGCAGATTTCTGTGAAGACCTTACGGGAAA	+	161
M Q I F V K T L T G K		
ACGATCACGCTCGAGgtacgaaccaggtggcgtgagaagcgaaggcctgc	+	311
T I T L E		
cagaggccctctatgctcgcttaaa <u>actt</u>	+	141
HindIII		
Abp. 56		

7/14

1 2



*Abb. 6*

8/14

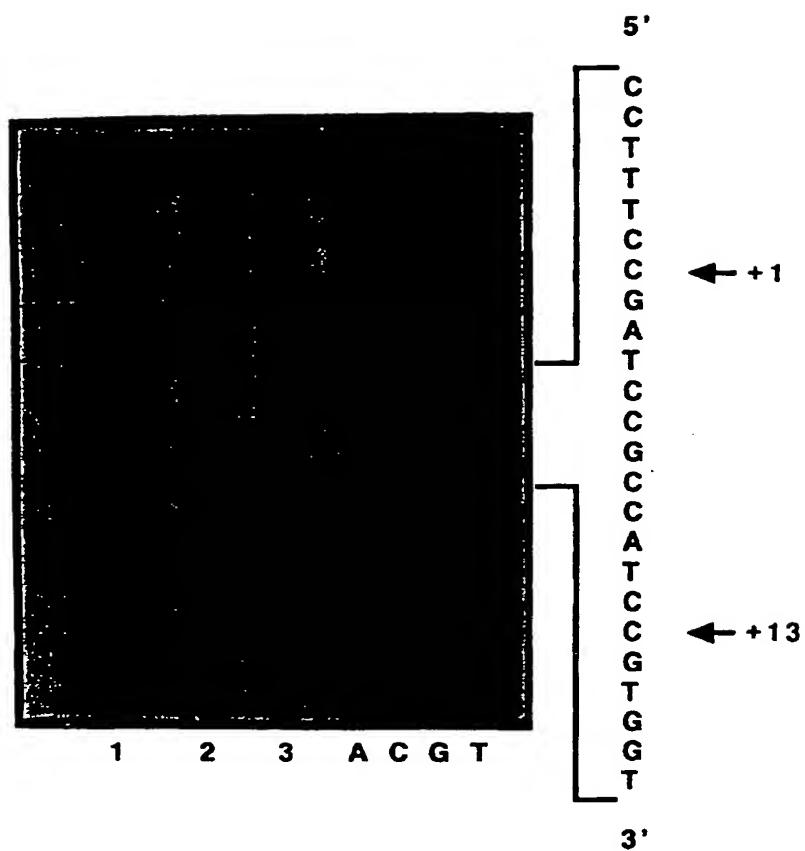


Abb. 7

9/14

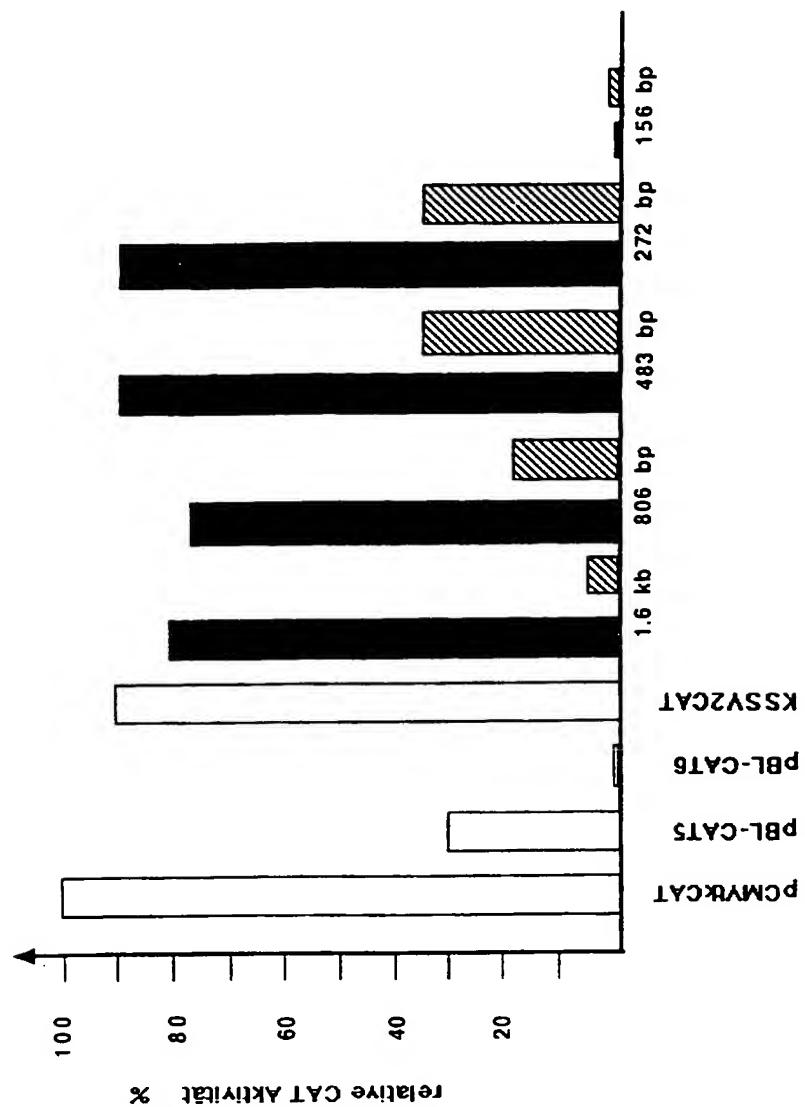


Abb. 8

10/14

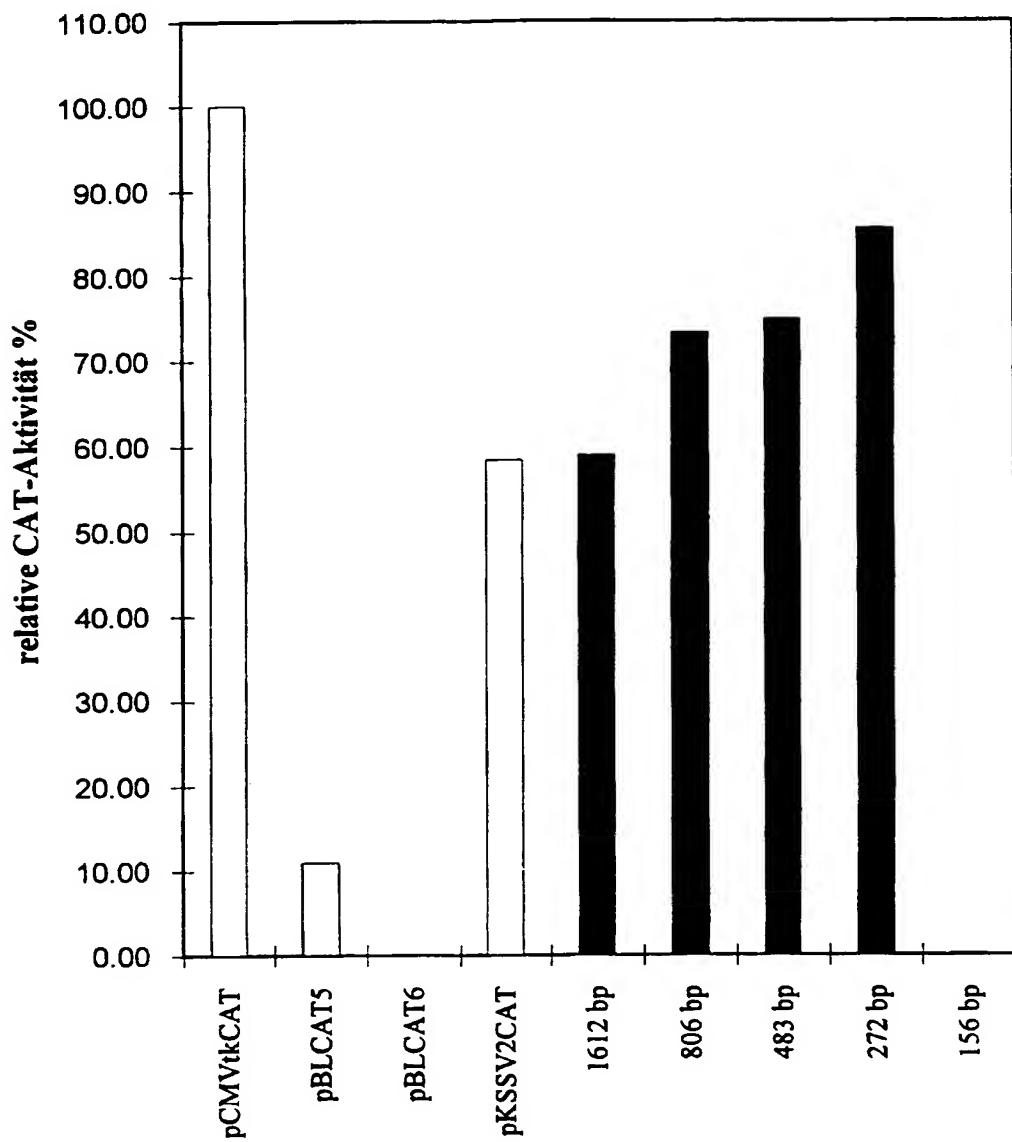


Abb. 9

11/14

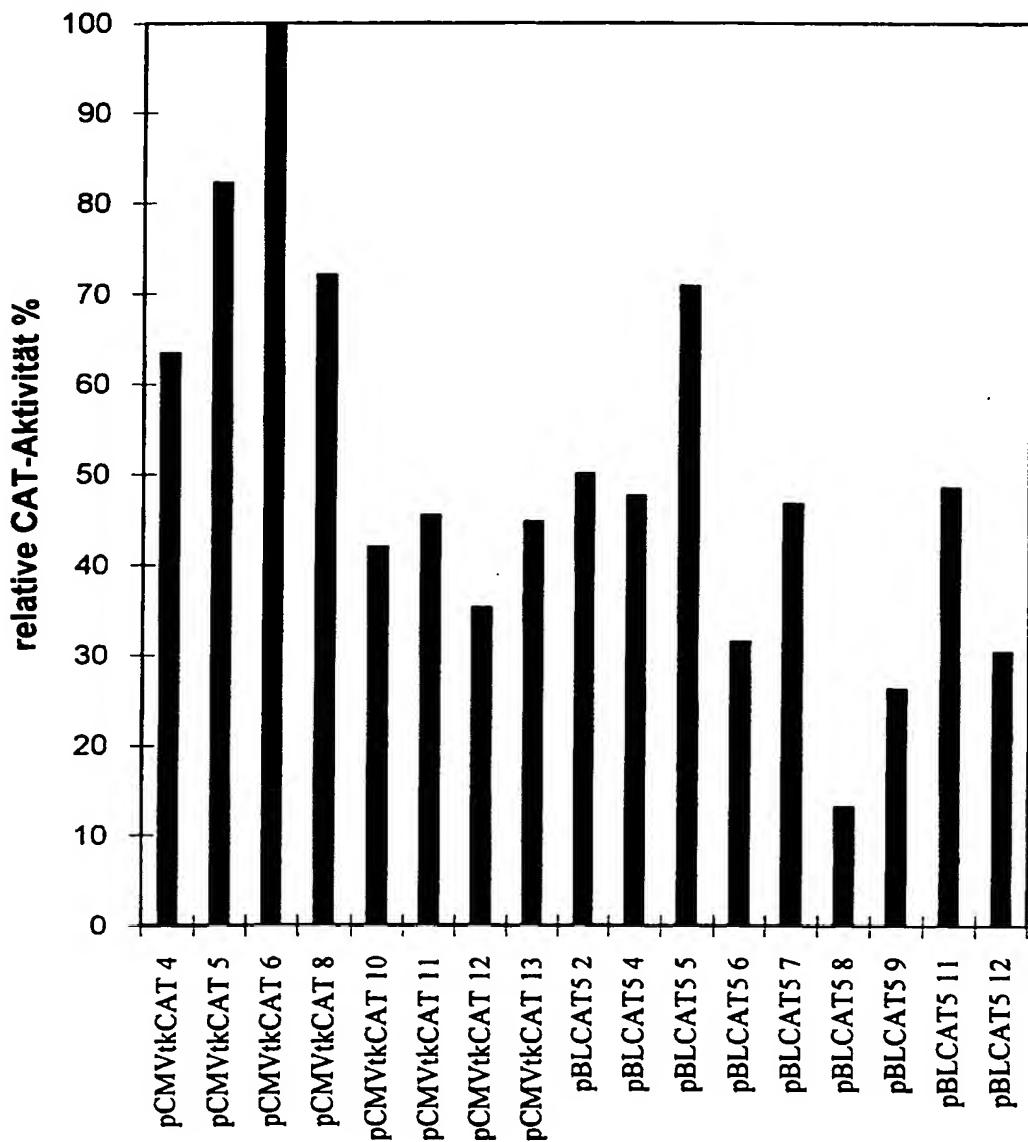


Abb. 10

12/14

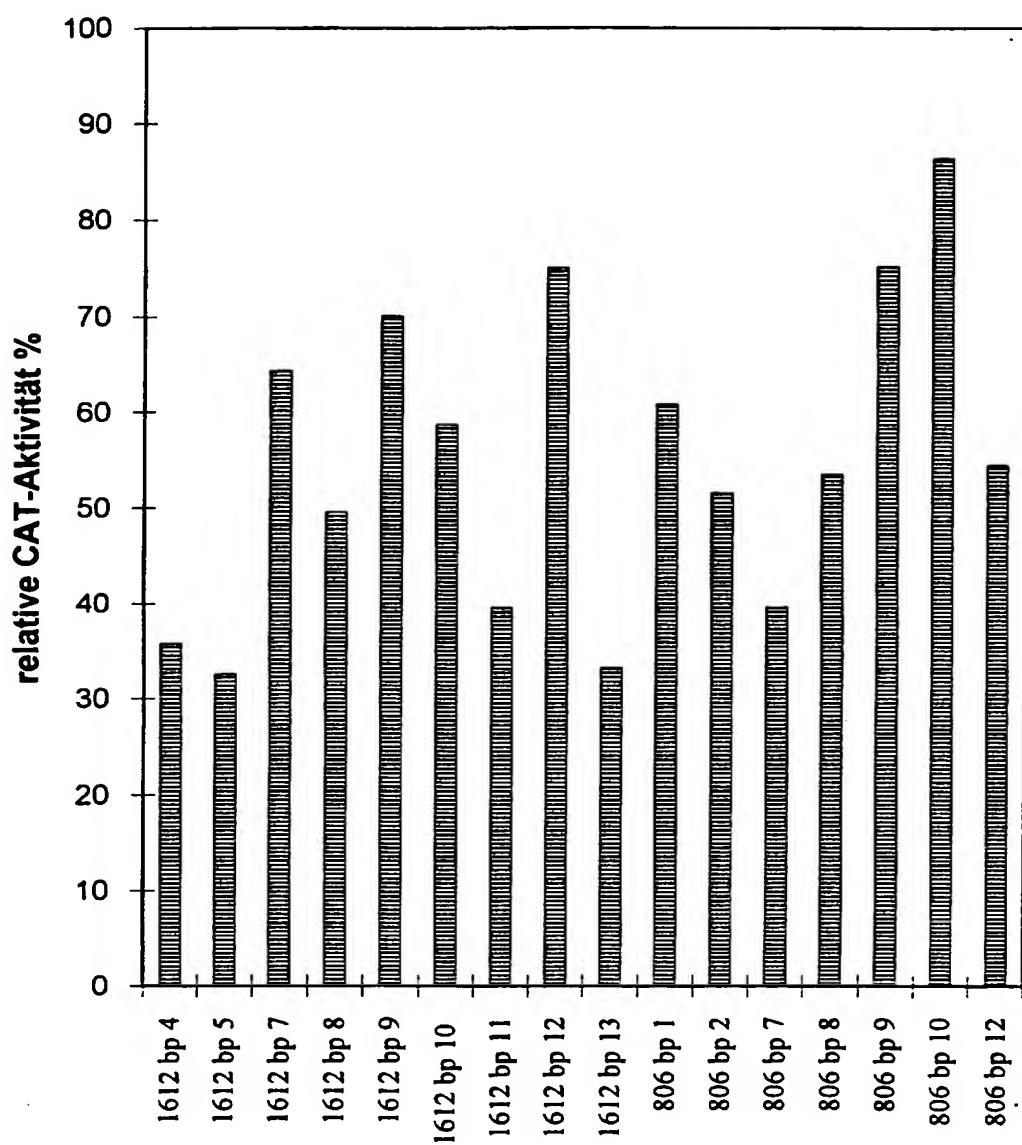


Abb. 11

13/14

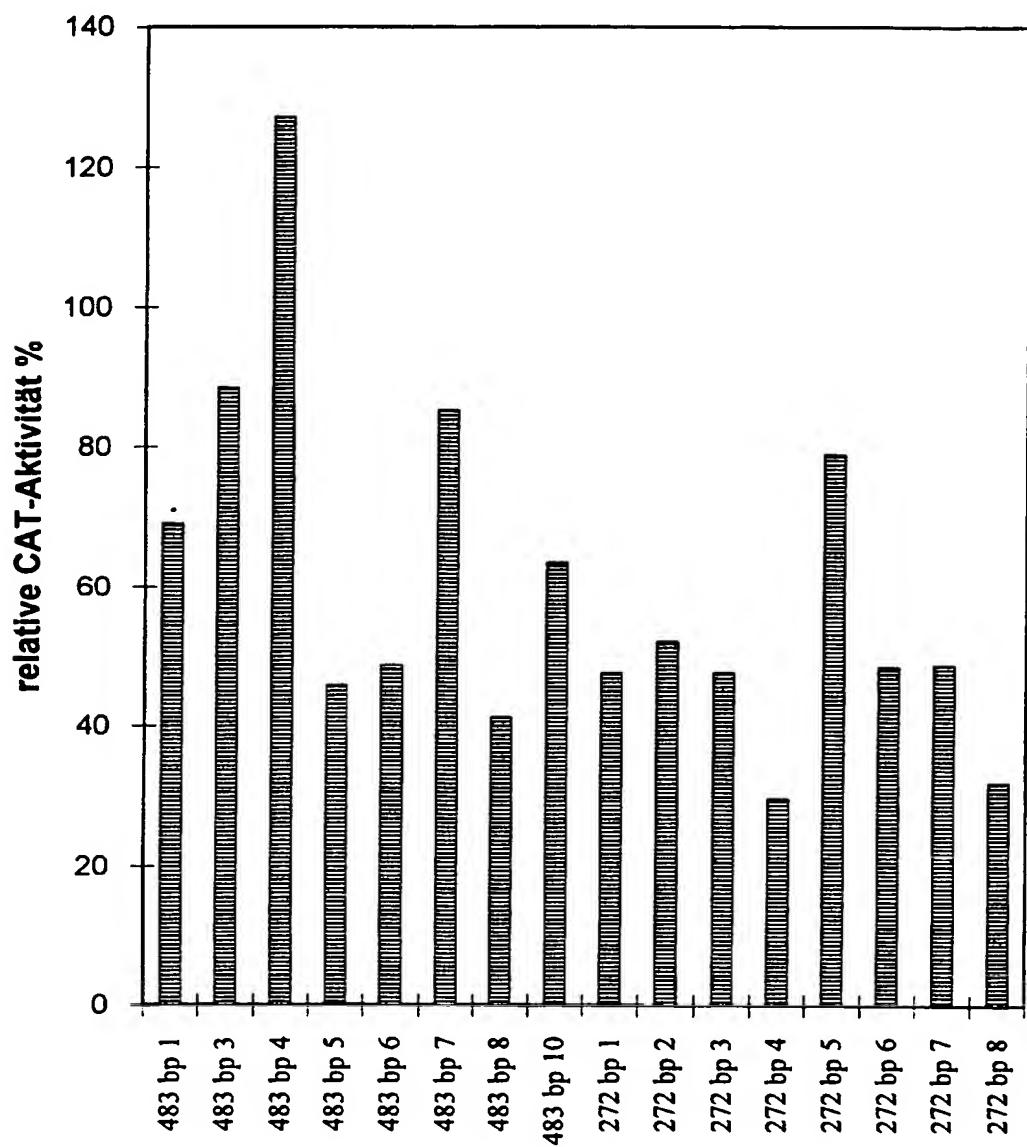


Abb. 12

14/14

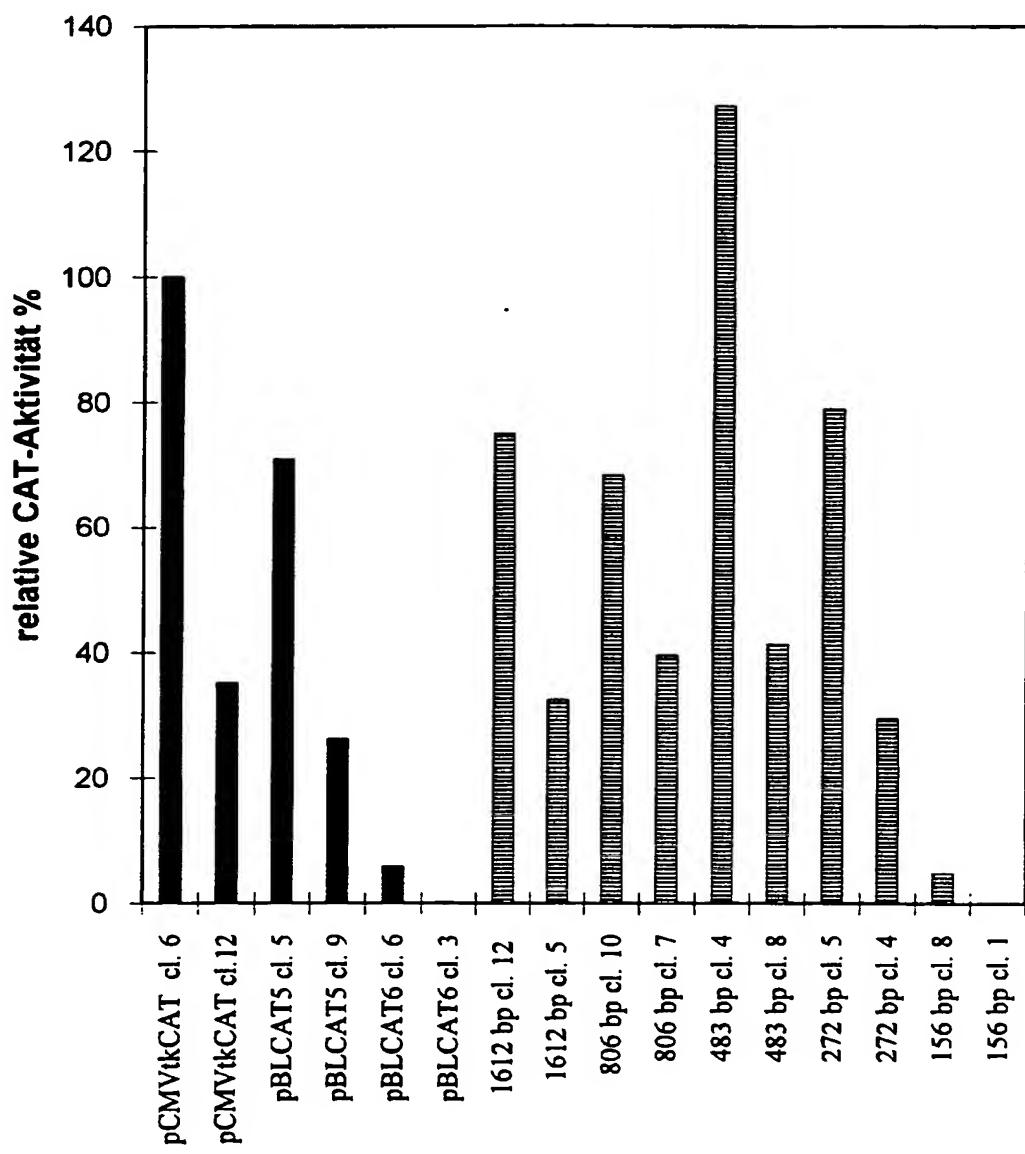


Abb. 13

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 96/04631

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N15/12 C12N15/85 C07K14/47 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12N C07K C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIOCHIMICA BIOPHYSICA ACTA, vol. 1204, 1994, ELSEVIER SCIENCE, AMSTERDAM, NL, pages 271-278, XP000644352 M. NENOI ET AL.: "Novel structure of a Chinese hamster polyubiquitin gene" see the whole document ---	20
X	NATURE, vol. 328, 1987, MACMILLAN JOURNALS LTD., LONDON, UK, pages 823-827, XP002024857 A. ARTISHEVSKY ET AL.: "Cell-cycle regulatory sequences in a hamster histone promoter and their interactions with cellular factors" see the whole document ---	20 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## * Special categories of cited documents :

- *'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *'E' earlier document but published on or after the international filing date
- *'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *'&' document member of the same patent family

2

Date of the actual completion of the international search

10 February 1997

Date of mailing of the international search report

26.02.97

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 96/04631

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>EUR. J. BIOCHEM.,      vol. 220, no. 2, March 1994, SPRINGER,      BERLIN, D,      pages 395-402, XP000664346      H.A.R. BLUYSEN ET AL.: "The      interferon-stimulated gene 54K promoter      contains two adjacent functional      interferon-stimulated response elements of      different strength, which act      synergistically for maximal      interferon-alpha inducibility"      see the whole document      ---</p>	20
A	<p>J. BIOL. CHEM.,      vol. 260, no. 12, 25 June 1985, AM. SOC.      BIOCHEM. MOL.BIOL.,INC.,BALTIMORE,US,      pages 7609-7613, XP002024621      P.K. LUND ET AL.: "Nucleotide sequence      analysis of a cDNA encoding human      ubiquitin reveals that ubiquitin is      synthesized as a precursor"      see the whole document      ---</p>	1-30
A	<p>BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH      COMMUNICATIONS 215 (2). 1995. 682-690.      ISSN: 0006-291X,      13 October 1995, XP002024622      CHAN Y-L ET AL: "The carboxyl extensions      of two rat ubiquitin fusion proteins are      ribosomal proteins S27a and L40."      see the whole document      ---</p>	1-30
A	<p>GENE,      vol. 107, 1991, ELSEVIER SCIENCE      PUBLISHERS,B.V.,AMSTERDAM,NL;,      pages 205-212, XP002024623      K. CHEN AND I. RUBENSTEIN:      "Characterization of the structure and      transcription of an ubiquitin fusion gene      from maize"      see the whole document      ---</p>	1-30
A	<p>EMBO J.,      vol. 6, no. 5, May 1987, OXFORD UNIVERSITY      PRESS,GB;;      pages 1429-1439, XP002024624      E. ÖZKAYNAK ET AL.: "The yeast ubiquitin      genes: a family of natural gene fusions"      see the whole document      ---</p>	1-30
2		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 96/04631

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. BIOL. CHEM., vol. 268, no. 26, 15 September 1993, AM. SOC. BIOCHEM. MOL.BIOL., INC., BALTIMORE, US, pages 19545-19551, XP002024625 D. JONES AND E.P. CANDIDO: "Novel ubiquitin-like ribosomal protein fusion genes from the nematodes <i>Caenorhabditis</i> <i>elegans</i> and <i>Caenorhabditis briggsae</i> " see the whole document ---	1-30
A	NATURE, vol. 338, 30 March 1989, MACMILLAN JOURNALS LTD., LONDON, UK, pages 438-440, XP002024626 K.L. REDMAN AND M. RECHSTEINER: "Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a" cited in the application see the whole document ---	1-30
A	BRITISH J. CANCER, vol. 65, 1992, MACMILLIAN PRESS, LTD., LONDON UK, pages 65-71, XP000615669 S.M. ADAMS ET AL.: "Differential expression of translation-association genes in benign and malignant tumours" cited in the application see the whole document ---	1-30
A	CANCER RES 53 (8). 1993. 1916-1920. CODEN: CNREA8 ISSN: 0008-5472, 15 April 1993, XP002024627 WONG J M ET AL: "UBIQUITIN RIBOSOMAL PROTEIN S27A GENE OVEREXPRESSED IN HUMAN COLORECTAL CARCINOMA IS AN EARLY GROWTH RESPONSE GENE." cited in the application see the whole document ---	1-30
A	FEBS LETTERS, vol. 322, no. 3, May 1993, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, pages 235-239, XP002024628 N. SHIMBARA ET AL.: "Down-regulation of ubiquitin gene expression during differentiation of human leukemia cells" cited in the application see the whole document ---	1-30
2	-/-	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP 96/ 04631

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

**Remark:** Although claim 28 relates to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out, based on the alleged effects of the compound or composition.
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 96/04631

## C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GENE, vol. 110, 1992, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS,B.V.,AMSTERDAM,NL;, pages 129-130, XP002024629 M. BOSHART ET AL.: "Reporter constructs with low background activity utilizing the cat gene" cited in the application see the whole document -----	1-30

2

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 96/04631

**A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 6 C12N15/12 C12N15/85 C07K14/47 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)  
IPK 6 C12N C07K C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BIOCHIMICA BIOPHYSICA ACTA, Bd. 1204, 1994, ELSEVIER SCIENCE, AMSTERDAM, NL, Seiten 271-278, XP000644352 M. NENOI ET AL.: "Novel structure of a Chinese hamster polyubiquitin gene" siehe das ganze Dokument ---	20
X	NATURE, Bd. 328, 1987, MACMILLAN JOURNALS LTD., LONDON, UK, Seiten 823-827, XP002024857 A. ARTISHEVSKY ET AL.: "Cell-cycle regulatory sequences in a hamster histone promoter and their interactions with cellular factors" siehe das ganze Dokument ---	20 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

'T' Später Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

'&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

2

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. Februar 1997

Anmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

26.02.97

Name und Postanschrift der internationale Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/04631

C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>EUR. J. BIOCHEM.,  Bd. 220, Nr. 2, März 1994, SPRINGER,  BERLIN, D.  Seiten 395-402, XP000664346  H.A.R. BLUYSEN ET AL.: "The  interferon-stimulated gene 54K promoter  contains two adjacent functional  interferon-stimulated response elements of  different strength, which act  synergistically for maximal  interferon-alpha inducibility"  siehe das ganze Dokument  ----</p>	20
A	<p>J. BIOL. CHEM.,  Bd. 260, Nr. 12, 25.Juni 1985, AM. SOC.  BIOCHEM. MOL.BIOL.,INC.,BALTIMORE,US,  Seiten 7609-7613, XP002024621  P.K. LUND ET AL.: "Nucleotide sequence  analysis of a cDNA encoding human  ubiquitin reveals that ubiquitin is  synthesized as a precursor"  siehe das ganze Dokument  ----</p>	1-30
A	<p>BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH  COMMUNICATIONS 215 (2). 1995. 682-690.  ISSN: 0006-291X,  13.Oktober 1995, XP002024622  CHAN Y-L ET AL: "The carboxyl extensions  of two rat ubiquitin fusion proteins are  ribosomal proteins S27a and L40."  siehe das ganze Dokument  ----</p>	1-30
A	<p>GENE,  Bd. 107, 1991, ELSEVIER SCIENCE  PUBLISHERS,B.V.,AMSTERDAM,NL;,  Seiten 205-212, XP002024623  K. CHEN AND I. RUBENSTEIN:  "Characterization of the structure and  transcription of an ubiquitin fusion gene  from maize"  siehe das ganze Dokument  ----</p>	1-30
A	<p>EMBO J.,  Bd. 6, Nr. 5, Mai 1987, OXFORD UNIVERSITY  PRESS,GB;,  Seiten 1429-1439, XP002024624  E. ÖZKAYNAK ET AL.: "The yeast ubiquitin  genes: a family of natural gene fusions"  siehe das ganze Dokument  ----</p>	1-30
2		-/-

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Int. nationales Aktenzeichen	PCT/EP 96/04631
------------------------------	-----------------

**C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	J. BIOL. CHEM., Bd. 268, Nr. 26, 15.September 1993, AM. SOC. BIOCHEM. MOL.BIOL.,INC.,BALTIMORE,US, Seiten 19545-19551, XP002024625 D. JONES AND E.P. CANDIDO: "Novel ubiquitin-like ribosomal protein fusion genes from the nematodes <i>Caenorhabditis elegans</i> and <i>Caenorhabditis briggsae</i> " siehe das ganze Dokument ---	1-30
A	NATURE, Bd. 338, 30.März 1989, MACMILLAN JOURNALS LTD., LONDON,UK, Seiten 438-440, XP002024626 K.L. REDMAN AND M. RECHSTEINER: "Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-30
A	BRITISH J. CANCER, Bd. 65, 1992, MACMILLIAN PRESS, LTD., LONDON UK, Seiten 65-71, XP000615669 S.M. ADAMS ET AL.: "Differential expression of translation-association genes in benign and malignant tumours" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-30
A	CANCER RES 53 (8). 1993. 1916-1920. CODEN: CNREA8 ISSN: 0008-5472, 15.April 1993, XP002024627 WONG J M ET AL: "UBIQUITIN RIBOSOMAL PROTEIN S27A GENE OVEREXPRESSED IN HUMAN COLORECTAL CARCINOMA IS AN EARLY GROWTH RESPONSE GENE." in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-30
A	FEBS LETTERS, Bd. 322, Nr. 3, Mai 1993, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Seiten 235-239, XP002024628 N. SHIMBARA ET AL.: "Down-regulation of ubiquitin gene expression during differentiation of human leukemia cells" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-30
2	-/-	

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/04631

**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr. weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
**Bemerkung: Obwohl der(die) Anspruch(üche) 28 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht(en), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführte Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.**
2.  Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3.  Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
 Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PC1/EP 96/04631
-------------------------------------------------

**C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>GENE,          Bd. 110, 1992, ELSEVIER SCIENCE          PUBLISHERS, B.V., AMSTERDAM, NL;,          Seiten 129-130, XP002024629          M. BOSHART ET AL.: "Reporter constructs          with low background activity utilizing the          cat gene"          in der Anmeldung erwähnt          siehe das ganze Dokument          -----</p>	1-30
2		